

**AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR KIEFERORTHOPÄDIE  
PROF. DR. DR. PETER PROFF  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

*In Vitro* Untersuchung zur Rolle von mechanischer Kraftapplikation auf  
PDL-Zellen in Anwesenheit parodontal-pathogener Keime

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Christian-Andreas Mangelkramer

2013



**AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR KIEFERORTHOPÄDIE  
PROF. DR. DR. PETER PROFF  
FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

*In Vitro* Untersuchung zur Rolle von mechanischer Kraftapplikation auf  
PDL-Zellen in Anwesenheit parodontal-pathogener Keime

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Christian-Andreas Mangelkramer

2013

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Peter Proff
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Michael Behr
Tag der mündlichen Prüfung:	09.09.2013



gewidmet

meinen Eltern, Brüdern und Großeltern

## **Inhalt**

## **Inhalt**

<b>1. Einleitung und Fragestellung</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht</b>	<b>2</b>
2.1 Der Zahnhalteapparat	2
2.2 Die Parodontalligament-Zellen (PDL-Zellen)	4
2.3 Die Parodontitis	7
2.3.1 Ätiologie	7
2.3.2 Die parodontal-pathogenen Keime	9
2.3.3 Der Krankheitsverlauf einer Parodontitis	10
2.4 Die Knochenmodellierung während der KFO-Behandlung	12
2.4.1 Die Phasen der Zahnbewegung	12
2.4.2 Die molekularen Abläufe der Knochenmodellierung	13
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>18</b>
3.1 Material	18
3.1.1 Technisches Zubehör und Verbrauchsmaterialien	18
3.1.2 Chemikalien und Biochemikalien	20
3.2 Patientenauswahl	23
3.3 Vorbereitende Maßnahmen für die <i>in vitro</i> Versuchsreihe	23
3.3.1 Isolation der PDL-Zellen	23
3.3.2 Nachweis der PDL-Zellen	25
3.3.2.1 Isolierung der RNA	26
3.3.2.2 Synthese der c-DNA	26
3.3.2.3 Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)	27
3.3.2.4 Die Agarose-Gelelektrophorese	29

3.3.3	Passagieren, Trypsinieren und Kultivieren der PDL-Zellen	30
3.3.4	Bestimmung der Zellzahl	31
3.4	Simulation kieferorthopädischer Kräfte und Stimulation mit parodontal-pathogenen Keimen	32
3.4.1	Der Versuchsaufbau	32
3.4.2	Die Versuchsdurchführung	33
3.5	Untersuchungsmethoden	34
3.5.1	Bestimmung der Genexpression mittels Real-Time-PCR	34
3.5.1.1	Durchführung	34
3.5.1.2	Bestimmung der Genexpression	37
3.5.2	Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) von RANKL	38
3.5.3	Proteinbestimmung mittels eines Western-Blots	39
3.5.3.1	Isolation der Proteine aus den PDL-Zellen	39
3.5.3.2	Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran	40
3.5.3.3	Immunologische Färbung der Proteine OPG und RANKL	42
3.5.4	Osteoklastendifferenzierungsassay	44
3.5.4.1	Co-Kulturen von PDL-Zellen und RAW 264.7-Zellen	44
3.5.4.2	TRAP-Färbung der Co-Kulturen	45
3.5.5	Statistische Auswertung	46
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
4.1	Isolation und Charakterisierung der PDL-Zellen	47
4.2	Stimulation mit <i>Fusobacterium nucleatum</i> und Kraftapplikation	49
4.2.1	Genexpression von OPG	49
4.2.2	Genexpression von RANKL	50
4.2.3	RANKL/OPG-Verhältnis	51

4.3 Stimulation mit <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> und Kraftappli- kation	53
4.3.1 Genexpression von OPG	53
4.3.2 Genexpression von RANKL	54
4.3.3 RANKL/OPG-Verhältnis	55
4.4 Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	57
4.5 Western-Blot Quantifizierung	57
4.6 Osteoklastendifferenzierungsassay mit TRAP-Färbung der Co-Kulturen	58
<b>5. Diskussion</b>	<b>60</b>
5.1 Diskussion der Methoden	61
5.2 Diskussion der Ergebnisse	63
5.3 Konsequenzen für den klinischen Alltag	69
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>71</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>73</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>81</b>
<b>9. Tabellenverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	
<b>Danksagung</b>	

## 1 Einleitung und Fragestellung

Auf Grund der guten medizinischen Versorgung und steigenden Lebensqualität in den meisten europäischen Industriestaaten findet eine Zunahme einer immer älter werdenden Bevölkerung statt. Zur Verbesserung der Mundhygiene, zur Vermeidung von kranio-mandibulären Dysfunktionen, aber auch zur Verbesserung des ästhetischen Erscheinungsbildes unterziehen sich immer mehr Erwachsene und Senioren einer kieferorthopädischen Therapie. In klinischen Untersuchungen weisen diese Patientengruppen häufig parodontale Problematiken auf. Wie eine Studie von Micheelis und Schiffner (2006) belegt, liegen bei Patienten im Alter von 15 Jahren bei 14% erhöhte Sondierungstiefen ( $> 3,5$  mm) vor. Bei den Patienten im Alter von 35 bis 44 Jahren sind es bereits 74% und bei den 65 bis 74-Jährigen sogar 88%. Die Ursachen dafür sind das Vorhandensein supra- und subgingivaler bakterieller Plaque. Zudem zeigt die klinische Erfahrung, dass bei Patienten mit parodontal-vorgeschädigten Gebissen während einer kieferorthopädischen Therapie ein übermäßiger Knochen- und Attachmentverlust stattfinden kann.

Zur Untersuchung dieses klinischen Hintergrundes sowie der Zusammenhänge von Mundhöhlenmilieu und den beteiligten Knochenstrukturen soll auch die hier vorliegende Doktorarbeit beitragen. Diese *in vitro* Studie soll erstmals Zusammenhänge erklären, die eintreten können, wenn kieferorthopädische Zahnbewegungen an Zähnen mit aktiven parodontalen Entzündungen durchgeführt werden. Die Zielsetzung der Arbeit war es deshalb, die Veränderung der Genexpression des OPG/RANKL-Systems in parodontalen Ligamentzellen (PDL-Zellen; auch genannt: Ligamenta dentoalveolaria; Fibrae dentoalveolares, Desmodont) zu untersuchen, die in Gegenwart von Endotoxinen parodontal-pathogener Keime einer *in vitro*-stimulierten orthodontischen Kraft ausgesetzt waren.

Die Arbeit basiert auf molekularbiologischen Untersuchungen und Experimenten und legt das Augenmerk auf die Wechselwirkung zwischen parodontal-pathogenen Keimen und der osteoklastischen Aktivität bei der Knochenresorption durch Anlegen von Kräften an den Zahn. Im Vordergrund steht hierbei die Untersuchung des Verhaltens von PDL-Zellen auf diese Keime bei angelegten mechanischen Kräften. Anhand der Ergebnisse soll erforscht werden, ob die Anwesenheit bestimmter Keimarten und das Anlegen von orthodontischen Kräften eine Veränderung auf die von den PDL-Zellen vermittelte Osteoklastogenese hat.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Der Zahnhalteapparat

Der Zahnhalteapparat (Parodontium) dient der Befestigung der Zähne in der Alveole und dämpft die Kaukräfte. Zudem schirmt dieser die Zahnwurzel von der Mundhöhle ab und verhindert dadurch das Eindringen von pathogenen Keimen. Er wird als genetische, strukturelle, biologische und funktionelle Einheit bezeichnet (Linß und Fanghänel, 1999), weil an seinem Aufbau verschiedene Gewebearten (Abb. 1), wie das Wurzelzement, die Wurzelhaut (Desmodont), der Alveolarknochen und das Zahnfleisch (Gingiva), beteiligt sind (Radlanski, 2011).

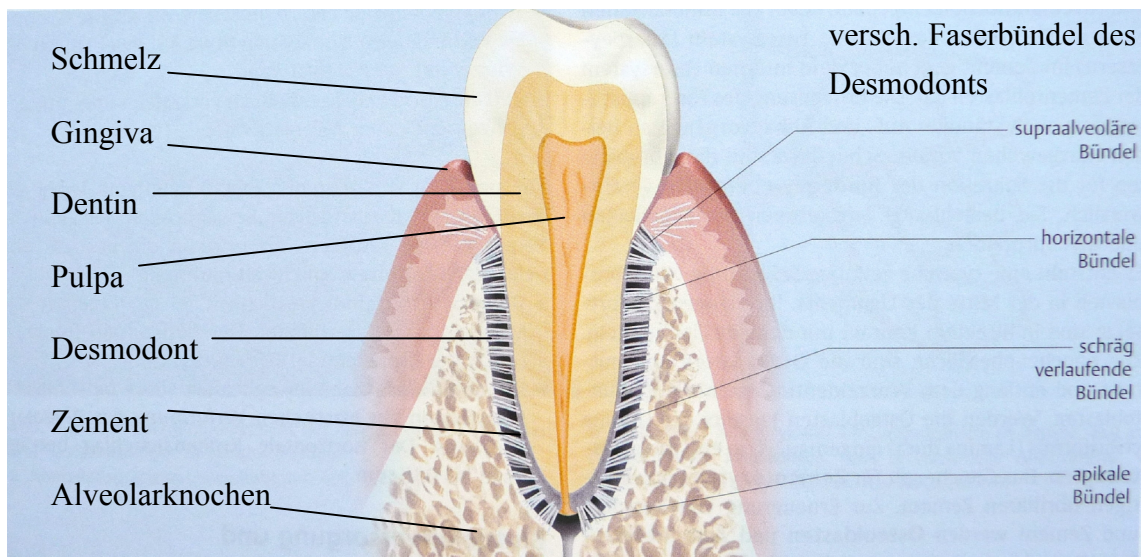


Abb. 1. Aufbau des Zahnhalteapparates (aus P. Gängler und Mitarb., 2010).

Das Zahnfleisch seinerseits weist zwei unterschiedliche Formen auf, die befestigte und die marginale Gingiva. Erstere ist über Bindegewebsfasern mit dem Knochen (Fibrae alveolingivales) und dem Zahnzement (Fibrae dentogingivales) verbunden und daher unverschieblich (Linß und Fanghänel, 1999). Nach koronal geht die befestigte Gingiva in die marginale Gingiva über. Sie liegt am Zahnhals an und verläuft girlandenförmig entlang der Schmelz-Zement-Grenze. Nach apikal ist die mukogingivale Grenze lokalisiert, ab der das unverschiebbare Zahnfleisch in die verschiebbare Mundschleimhaut (Mukosa) übergeht. Histologisch gesehen handelt es sich bei der Gingiva um ein mehrschichtiges, unverhorntes Plattenepithel (Hellwig und Mitarb., 2009).

Zwischen marginaler Gingiva und dem Zahnhals ist eine Zahnfleischfurche (Sulkus) von 2 mm sondierbar (Schumacher, 1991). Bei pathogenen Prozessen ist diese vergrößert und wird als Tasche bezeichnet. Die Zellen des oralen Sulkusepithels produzieren das sog. Sulkusfluid, welches durch seine immunologischen Bestandteile den Zahnhalteapparat vor Bakterien und Noxen schützen soll (Gängler und Mitarb., 2010). Apikal des Sulkus heftet sich das Saumepithel (Abb. 2) dem Zahn an und verhindert ebenfalls das Eindringen von Bakterien in das Parodontium (Schumacher, 1991).

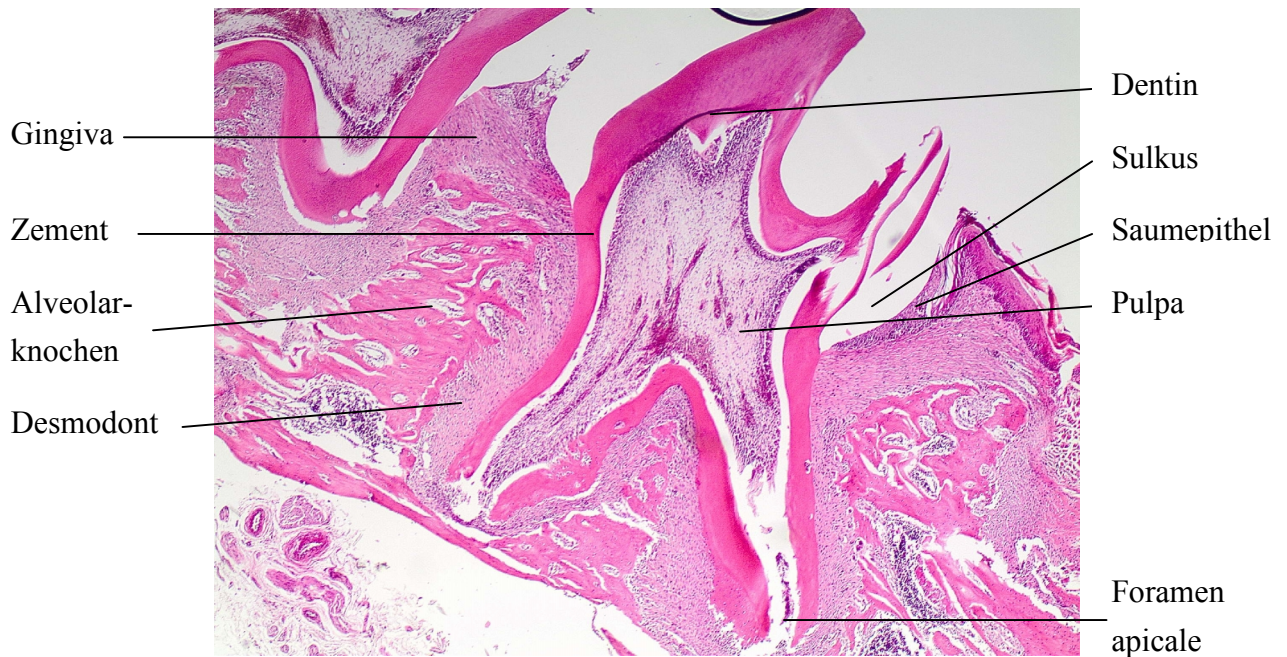


Abb. 2. Mikroskopischer Aufbau des Zahnes und des Parodontiums von einer Ratte (HE,  $\times 40$ ) (Foto: Dr. P. Römer, Poliklinik für Kieferorthopädie, Universitätsklinikum Regensburg).

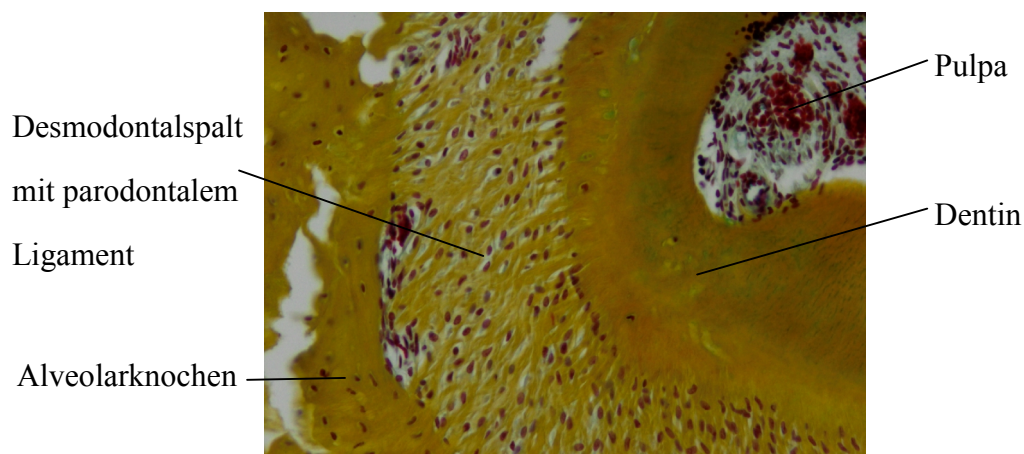


Abb. 3. Mikroskopischer Aufbau des Parodontiums (Pentachrom,  $\times 200$ ) (Foto: Dr. P. Römer, Poliklinik für Kieferorthopädie, Universitätsklinikum Regensburg).

Zwischen dem Wurzelzement und dem Alveolarknochen liegt mit einer Schichtdicke von ca. 0,2 mm die Wurzelhaut (Desmodont) (Radlanski, 2011). Es ist sehr gut durchblutet und weist einen hohen Anteil an bindegewebigen Strukturen (parodontales Ligament) auf. Vom Alveolarknochen laufen schräg durch das Desmodont nach apikal zum Zahnzement kollagene Fasern, welche Fibrae dentoalveolares bzw. Sharpey'sche Fasern genannt werden (Linß und Fanghänel, 1999). Sie fixieren den Zahn in der Alveole und wandeln den Kaudruck auf die Zähne in Zugkräfte am Knochen um. Diese stellen für den Knochen einen funktionellen Reiz dar und verhindern den Abbau des Knochens (Lehmann und Hellwig, 2005). Die Produktion der kollagenen Strukturen erfolgt durch die hohe Anzahl an Fibroblasten im Desmodont. Neben diesen Zellen weisen das Desmodont und der angrenzende Knochen ebenfalls einen hohen Anteil an Osteoblasten und Osteoklasten auf, die am Knochenauf- und abbau beteiligt sind (Radlanski, 2011). Das Desmodont ist über die Zementoblasten zugleich Produktionsstätte für das Wurzelzement des Zahnes und versorgt diesen über Diffusion mit Nährstoffen (Heidemann und Mitarb., 2005). Das Wurzelzement gleicht seiner chemischen Zusammensetzung nach (61% Mineralien, 27% organische Matrix, 12% Wasser) dem menschlichen Knochen und wird in vier Arten unterschieden: azelluläres Fremdfaserzement, zelluläres Gemischtfaserzement, azellulär-afibrilläres Zement, zelluläres Eigenfaserzement (Strub und Mitarb., 2011). Die Schichtdicke des Zements nimmt von koronal (50 bis 150 µm) nach apikal (200 bis 600 µm) zu (Strub und Mitarb., 2011). Der Alveolarknochen besteht innen aus der Alveolenwand, in der Mitte aus der mit Fettmark gefüllten Spongiosa und außen aus der Kompakta (Strub und Mitarb., 2011). Auf Grund der hohen Zellpopulation wird die Wurzelhaut über ein ausgedehntes Netzwerk an Blutgefäßen aus dem Alveolarknochen über kleine Kanälchen (Volkmann-Kanäle) versorgt (Linß und Fanghänel, 1999). Im Bereich der Wurzelspitze kommen diese kumuliert vor. Sie werden als Wedl'sche Gefäßknäuel bezeichnet und dienen zur Abpufferung von Kaukräften (Hellwig und Mitarb., 2009).

## **2.2 Die Parodontalligament-Zellen (PDL-Zellen)**

Bei PDL-Zellen (Abb. 4) handelt es sich morphologisch um spindelförmige Zellen (Schendel und Mitarb., 1994), die nach dem Ort ihrer Herkunft, dem parodontalen Ligament (Synonyme: Desmodont, Ligamentum periodontale, dentoalveolärer Faserapparat, Desmodontalfasern, Sharpey-Fasern, Fibrae dentoalveolares, Fibrae cementoalveo-



lares), benannt sind (Strub und Mitarb., 2011). Sie verhalten sich ähnlich wie Fibroblasten und produzieren extrazelluläre Matrix, wie z.B. Kollagen. Sie sind am Aufbau und der Regeneration der bindegewebigen Strukturen im Desmodontalspalt beteiligt. Diese Zellen tragen folglich einen großen Teil zur Befestigung des Zahnes in der Alveole bei. Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass PDL-Zellen auch Merkmale von Osteoblasten besitzen. Sie können Proteine, die direkt am Knochenaufbau beteiligt sind, wie z.B. Osteonectin, produzieren (Jönsson et al., 2011). In Studien wurde nachgewiesen, dass PDL-Zellen an der Osteogenese und Zementogenese involviert sind (Sorman et al., 1990; Arceo et al., 1991). Allerdings ist immer noch unbekannt, ob sich PDL-Zellen zu Osteoblasten differenzieren können. Im Gegensatz zu reinen Osteoblasten lassen sich bei den Zellen des parodontalen Ligaments hohe Spiegel der alkalischen Phosphatase nachweisen (Basdra, 1997). Dieses Enzym ist ebenfalls am Knochenaufbau beteiligt. Eine detaillierte Beschreibung der Vorgänge bei Knochenauf- und abbau erfolgt in Kapitel 2.4.

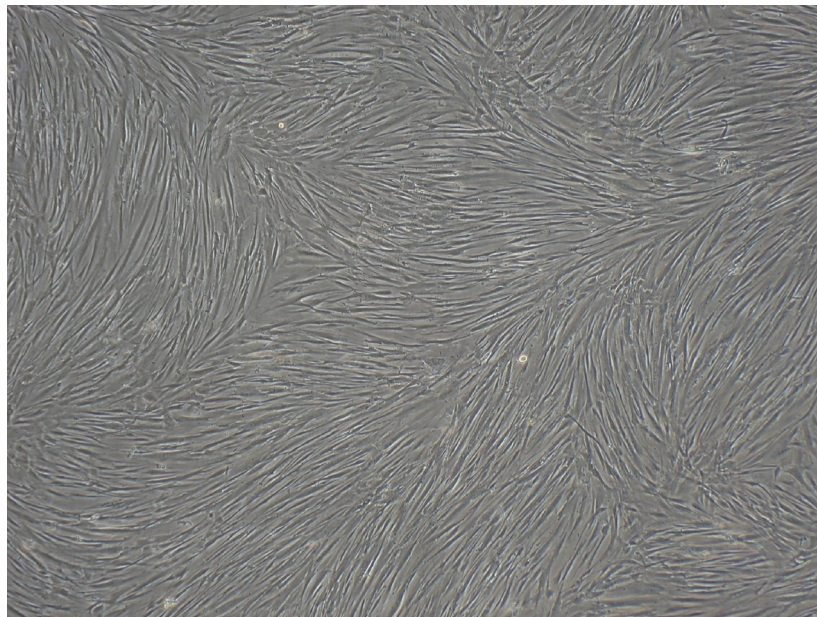


Abb. 4. Humane Primärzellkultur von PDL-Zellen ( $\times 100$ ).

PDL-Zellen besitzen wie Leukozyten und Makrophagen auch immunologische Fähigkeiten. In mehreren Experimenten wurde die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen als Immunantwort auf eine pathogene Reizung nachgewiesen. Dabei reagierten die Zellen auf bakterielle Lipopolysaccharide, die in der Zellmembran von Bakterien vorkommen, mit einer starken Ausschüttung o.g. Stoffe (Sun et al., 2010; Jönsson et al., 2011). Die Lipopolysaccharide binden dabei initial an die Oberflächenproteine CD-14

und MD-2 (Abb. 5). CD-14 ist der Makrophagenrezeptor für Lipopolysaccharide (Murphy et al., 2009). Der Toll-like Rezeptor-4 (TLR-4), der auf der Oberfläche der Zellen lokalisiert ist (Murphy et al., 2009), ist erst durch die Komplexbildung der Lipopolysaccharide in der Lage diese zu erkennen (Vollmar und Dingermann, 2005; Sun et al., 2010). Ab hier ist der Ausgangspunkt für den TLR-Signalweg definiert.

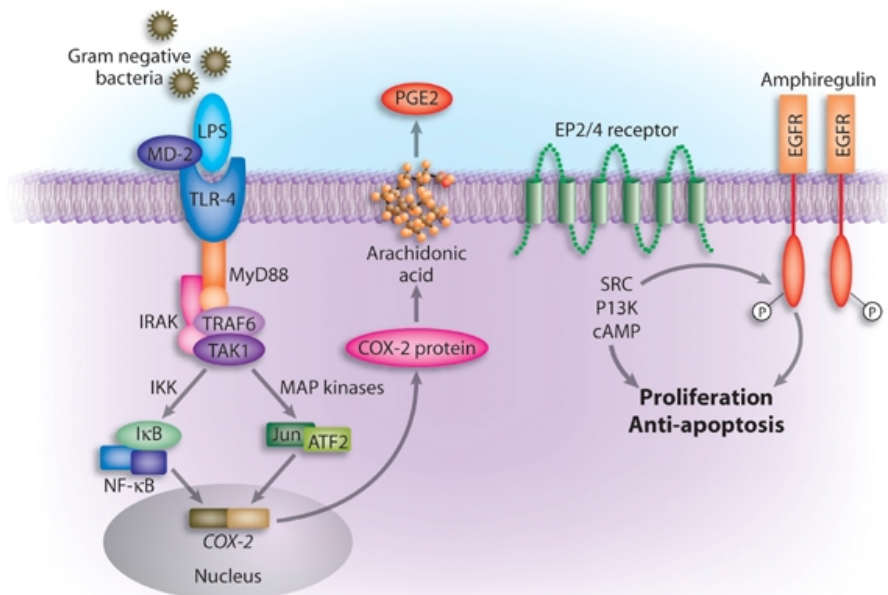


Abb. 5. TLR-Signalweg ausgelöst durch bakterielle Lipopolysaccharide  
(aus M. Fukata, M.T. Abreu, 2008).

TLR-4 löst in den PDL-Zellen einen MyD88-abhängigen und einen MyD88-unabhängigen Signalweg aus (Jönsson et al., 2011). Beim MyD88-abhängigen Signalweg bindet dieses an die IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK), bei der es sich um eine Serin/Threonin-Proteinkinase handelt (Murphy et al., 2009). Diese aktivierte Kinase bindet das Adaptorprotein Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiierter-Faktor-6 (TRAF-6) (Jönsson et al., 2011). Dieses Protein aktiviert die Kinase TAK1, welche ihrerseits einen IKK-Komplex phosphoryliert, der die Bildung des Transkriptionsfaktors Nuclear factor  $\kappa$  of activated B-cells (NF $\kappa$ B) fördert. Diese Stimulierung erfolgt durch die Entfernung des Inhibitors I $\kappa$ B (Murphy et al., 2009). NF $\kappa$ B wandert in den Zellkern und aktiviert die Bildung mehrerer Zytokine, wie z.B. Interleukin 1 $\beta$  und Interleukin 6, aber auch die Aktivierung der Cyclooxygenase 2 (COX-2) (Vollmar und Dingermann, 2005).

TAK1 ist verantwortlich für die Aktivierung der MAP-Kinasen (Mitogen-activated protein kinases). Dabei handelt es sich um Kinasen, die auf verschiedene Reize hin phosphoryliert werden und über die Phosphorylierung diverser Transkriptionsfaktoren zur Expression von Genen führen (Vollmar und Dingermann, 2005). In diesem Fall phosphorylieren diese JUN und aktivieren so den Activating transcription factor 2 (ATF2). Dieser Faktor wandert ebenfalls in den Zellkern und ermöglicht die Transkription und somit die Bildung o.g. Zytokine und von COX-2.

Beim MyD88-unabhängigen Weg ist das Adaptorprotein TRIF aktiv (Murphy et al., 2009). Dieses wandert zu TRAF-6 und bindet daran. Über die o.g. folgende Signalkaskade wird wieder NFκB aktiviert. Der Transkriptionsfaktor transloziert in den Nucleus und entfaltet an bestimmten Promotoren der DNA seine Wirkung (Jönsson et al., 2011). Über weitere Signalwege ist TRIF zudem in der Lage, die Bildung des Interferons β (INF-β) zu stimulieren (Murphy et al., 2009).

## **2.3 Die Parodontitis**

### **2.3.1 Ätiologie**

Die Parodontitis bezeichnet eine entzündliche Erkrankung des gesamten Zahnhalteapparates mit Gewebedestruktion. Dabei kommt es ohne Therapie zum Knochenabbau und in Verbindung mit der Gewebszerstörung zur Lockerung (Attachmentverlust) bzw. zum Verlust der Zähne (Rateitschak und Mitarb., 1984). Die Parodontitis untergliedert sich in eine chronische, eine aggressive und eine apikale Form. Sie kann sich lokal an einzelnen Zähnen aber auch generalisiert an vielen Zähnen manifestieren. Im Röntgenbild (OPT bzw. Zahnstatus) zeigt sich eine Parodontitis durch lokale oder generalisierte vertikale und horizontale Knocheneinbrüche (Abb. 6).

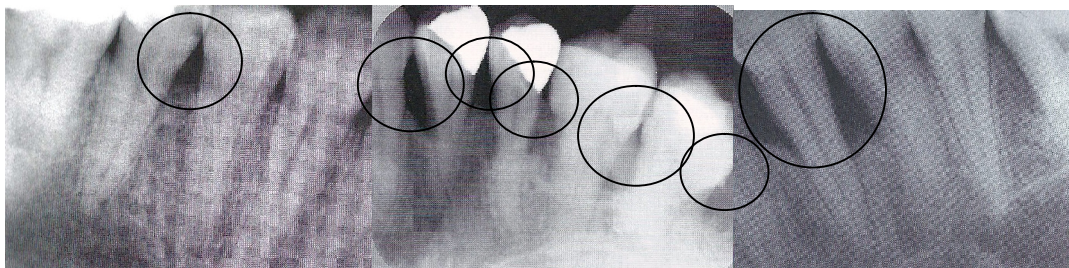


Abb. 6. In Zahnfilmen sichtbare vertikale und horizontale Knocheneinbrüche  
(aus D. Heidemann und Mitarb., 2005).

Die chronische Parodontitis kann in jedem Alter auftreten und geht häufig von supragingivaler Plaque und Konkrementen aus, an denen sich Bakterien anlagern können. Die Toxinfreisetzung der Keime bewirkt eine langsame Progression der Gewebedestruktion und des Knochenabbaus (Heidemann und Mitarb., 2005; Novak, 2006).

Die aggressive Parodontitis wird vor allem bei Patienten unter 30 Jahren diagnostiziert und ist durch eine rasche und massive Zerstörung der Gewebe im Zahnhalteapparat gekennzeichnet. An dieser Form sind u.a. die parodontal-pathogenen Keime *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* beteiligt (Gängler und Mitarb., 2010).

Der schnelle Abbau des Knochens wird auch durch eine zu starke Immunreaktion des Körpers gefördert, um ein Eindringen der Keime zu verhindern (Heidemann und Mitarb., 2005). Hauptursache an der Entstehung der Parodontitis sind parodontal-pathogene Bakterien, die sich an der supra- und subgingivalen Zahnplaque anlagern und über Toxine entzündliche Reaktionen hervorrufen (Novak, 2006). In den meisten Fällen geht einer Parodontitis eine Entzündung des Zahnfleisches (Gingivitis) voraus. Ursächlich ist in vielen Fällen die mangelnde Mundhygiene der Patienten. Allerdings können lokale und systemische Faktoren trotz ausreichender Mundhygiene die Plaqueretention fördern und somit die Entstehung einer Parodontitis begünstigen. Lokale Faktoren betreffen die Zahnstellung, Habits (z.B. Mundatmung), aber auch fehlerhafte und insuffiziente zahnärztliche Restaurationen (v.a. Füllungen, Kronen etc.) oder Dysfunktionen beim Speichelfluss. Systemische Faktoren sind das Rauchen oder bestimmte Grunderkrankungen wie Diabetes Mellitus, Osteoporose, Adipositas, HIV, Leukämie und genetische Dispositionen (Rateitschak und Mitarb., 1984; Hellwig und Mitarb., 2009). Diese äußern sich vor allem in einer Reduktion der Immunabwehr. Damit verbunden ist das erleichterte Eindringen von pathogenen Keimen in die Zahnfleischtaschen und in den Parodontalspalt (opportunistische Plaquehypothese) (Lehmann und Hellwig, 2005; Gängler und Mitarb., 2010). Aus diesem Umstand resultieren entzündliche Reaktionen mit fortschreitender Destruktion der umliegenden Gewebe (Novak, 2006). Therapeutische Ansätze sind in erster Linie eine Verbesserung der Mundhygiene, die Entfernung harter und weicher Beläge sowie Konkreme durch den Zahnarzt. Zudem ist mangelhafter Zahnersatz zu erneuern. Allgemeinmedizinische Grunderkrankungen sind umgehend zu therapieren, um einer Progredienz der Parodontitis vorzubeugen (Müller, 2006).

Während die chronische und die aggressive Form alle Strukturen des Zahnhalteapparates erfassen, handelt es sich bei der apikalen Parodontitis um einen pathologischen Entzündungsprozess an der Wurzelspitze eines Zahnes (Gängler und Mitarb., 2010). Dabei kann eine unbehandelte Pulpitis über die Wurzelkanäle der Zähne zu einer Entzündung des apikalen Parodonts führen. Röntgenologisch ist die apikale Parodontitis durch eine Aufhellung im Bereich der Wurzelspitze gekennzeichnet (Strub und Mitarb., 2011). Weitere Ursachen für diese Form der Parodontitis können Traumen, Parodontopathien und endodontische Therapien sein (Hellwig und Mitarb., 2009). In den meisten Fällen kann die Parodontitis apicalis mittels einer Wurzelkanalbehandlung über mehrere Sitzungen durch den Zahnarzt gut therapiert werden (Strub und Mitarb., 2011). Die entstandenen apikalen Läsionen heilen häufig reversibel mit Neubildung der Desmodontalstrukturen ab (Hellwig und Mitarb., 2009).

### **2.3.2 Die parodontal-pathogenen Keime**

Die Flora der Mundhöhle weist bis zu 900 verschiedene (aerobe und anaerobe) Bakterienarten auf, wobei die Streptokokken den zahlenmäßig größten Anteil bilden. Es finden sich pathogene wie auch apathogene Keime, die sich beim gesunden Menschen das Gleichgewicht halten (Hellwig und Mitarb., 2009). Jedoch sind die pathogenen Keime bei Änderung der Bedingungen in der Mundhöhle in der Lage, sich stark zu vermehren. Sie können so diverse Krankheiten, wie z.B. Karies, Gingivitis oder Parodontitis auslösen.

Die wichtigsten parodontal-pathogenen Keime sind *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Fusobacterium nucleatum* (Heidemann und Mitarb., 2005). In dieser Doktorarbeit liegt das Augenmerk auf *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Fusobacterium nucleatum*.

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ist ein kleines, nicht bewegliches, gramnegatives, mikroaerophiles Stäbchen, welches saccharolytisch tätig ist. Die Kolonien ordnen sich dabei nach einem Sternmuster (Abb. 7) an (Heidemann und Mitarb., 2005). Der Keim kann Enzyme und Toxine wie Kollagenase und Leukotoxin produzieren. Kollagenase trägt zur Gewebszerstörung im Zahnhalteapparat bei. Leukotoxin dagegen hemmt segmentkernige, neutrophile Granulozyten in ihrer Funktion und kann somit die Immunabwehr ausschalten (Heidemann und Mitarb., 2005).



*Fusobacterium nucleatum* gehört zur Familie der Bacteroidaceae und ist ein gramnegatives, unbewegliches, obligatorisch anaerobes Stäbchen (Abb. 8). *Fusobacterium nucleatum* wird in fünf Subspezies eingeteilt und ist ebenfalls über Toxine in der Lage, die Immunabwehr zu drosseln. Dieser Keim kann sowohl in sub- als auch in supragingivaler Plaque nachgewiesen werden (Hof und Dörries, 2005).

Beide Bakterien können beim Menschen ihre parodontal-schädigende Wirkung erst ab einer bestimmten Bakterienmenge (Gängler und Mitarb., 2010) und bei Änderung der Lebensbedingungen in der Mundhöhle entfalten (Heidemann und Mitarb., 2005).

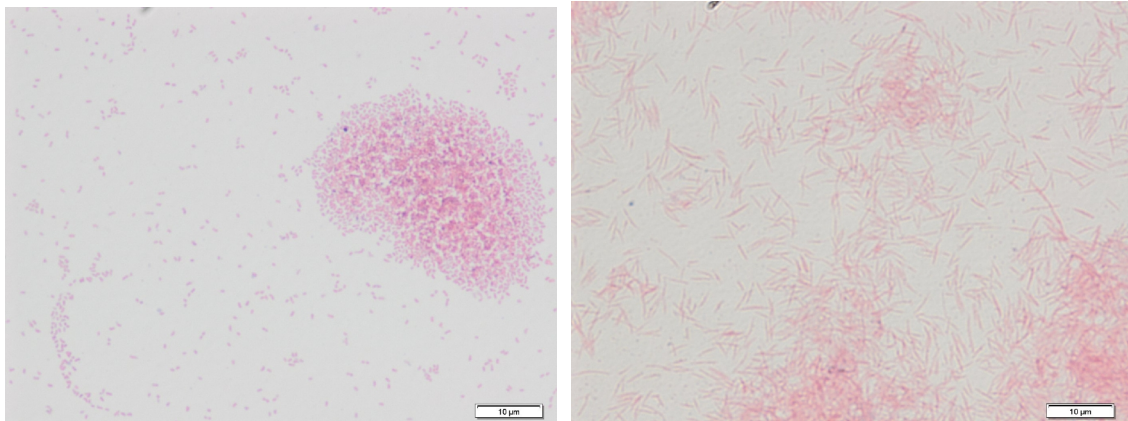


Abb. 7. Kultur von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ( $\times 1000$ ). Abb. 8. Kultur von *Fusobacterium nucleatum* ( $\times 1000$ ).

(Fotos: Dr. J. Köstler, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Regensburg).

### 2.3.3 Der Krankheitsverlauf einer Parodontitis

Eine Parodontitis entsteht über einen Zeitraum von mehreren Wochen (Heidemann und Mitarb., 2005; Gängler und Mitarb., 2010). Die Entwicklung der Parodontitis erfolgt dabei über die nachfolgend genannten vier Stadien (Abb. 9). Dabei wird von initial guten Mundhygieneverhältnissen und einer normalen Bakterienflora ausgegangen.

1. Initiale Gingivitis
2. Frühe Gingivitis
3. Chronische (Etablierte) Gingivitis
4. Übergang zur Parodontitis

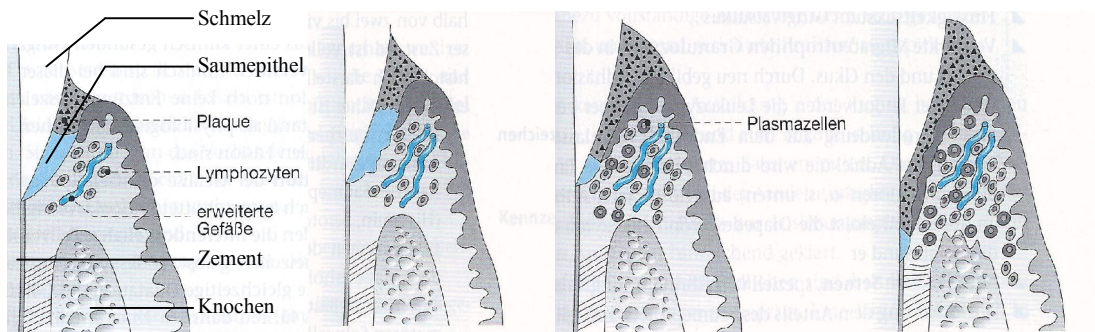


Abb. 9. Die vier Entwicklungsstadien der Parodontitis (v.l.n.r.)

(aus E. Hellwig und Mitarb., 2009).

Im Initialstadium (Nr. 1) kommt es auf Grund verschlechterter Mundhygiene zur Plaqueakkumulation an den supragingivalen Zahnbereichen (Gängler und Mitarb., 2010). Diese bietet den optimalen Nährboden für grampositive, aerobe Bakterien, die sich stark vermehren (Lehmann und Hellwig, 2005). Durch bakterielle Produkte z.B. Propionat und Lipopolysaccharide registrieren Saumepithelzellen über Rezeptoren deren Anwesenheit (Weber, 2003). Diese Zellen sezernieren Chemokine (z.B. IL-8). Sie wiederum aktivieren neutrophile Granulozyten, welche in das Saumepithel einwandern. Zudem versucht der Körper, den Bakterien mit Bildung von Sulkusfluid entgegenzuwirken (Gängler und Mitarb., 2010). Das Zahnfleisch verändert sich allmählich entzündlich. Eine frühe Gingivitis ist innerhalb weniger Tage die Konsequenz (Nr. 2). Bis Stadium 2 sind alle pathologischen Veränderungen vollständig reversibel. Ab diesem Zeitpunkt dringen gramnegative, anaerobe Keime in den Sulkus ein und vermehren sich dort (Lehmann und Hellwig, 2005; Gängler und Mitarb., 2010). Dabei scheiden sie Toxine aus, welche die Immunabwehr regulieren und eine initiale irreversible Zerstörung des Kollagengeflechts zur Folge haben. Aktivierte Makrophagen bilden Zytokine (z.B. IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), Chemokine (IL-8) und Prostaglandin E<sub>2</sub> (Weber, 2003). Durch intraepitheliale Risse bildet sich eine Zahnfleischtasche aus, als Resultat manifestiert sich eine etablierte Gingivitis (Nr. 3). Die Läsion schreitet immer weiter in die subgingivalen Bereiche voran und führt zu vermehrten Blutungen sowie zur Eiterbildung (Taschenabszess) (Nr. 4) (Lehmann und Hellwig, 2005; Gängler und Mitarb., 2010). Die Bakterien können immer weiter in den Zahnhalteapparat eindringen und zerstören diesen kontinuierlich. Der Faserapparat geht dabei irreversibel verloren. Durch diese Progression einerseits und die erhöhte Konzentrationen an IL-1 $\beta$  und PGE<sub>2</sub> andererseits werden Osteoklasten aktiviert und der Knochen irreversibel abgebaut (Delima et al., 2002; Gra-

ves et al., 2003; Weber, 2003). Der Zahn verliert weiter an Halt, bis er schließlich nur noch locker im Zahnfleisch liegt.

## **2.4 Die Knochenmodellierung während der KFO-Behandlung**

### **2.4.1 Die Phasen der Zahnbewegung**

Knochenumbauprozesse (Remodelling) finden im Kieferbereich physiologischerweise laufend statt (Kahl-Nieke, 2010). Diese Umbauvorgänge resultieren aus der Dentition sowie aus Wanderungen der Zähne. Im Bereich des Kieferknochens lassen sich aber auch durch Anlegen von Kräften mit Hilfe kieferorthopädischer Apparaturen große Veränderungen vornehmen. In der Richtung, in welche der Zahn wandert bzw. bewegt wird, wird ein Druck auf den Knochen ausgeübt. Dieser ist der physiologisch auslösende Reiz zum Knochenabbau (Kahl-Nieke, 2010). Dabei folgt die Knochenmodellierung über einen Zeitraum von 20 Tagen in drei Phasen (Reitan, 1967, 1971). Die erste Phase erstreckt sich über die ersten fünf Tage ab dem Zeitpunkt der Kraftapplikation. Sie wird als Phase der initialen Dämpfung bezeichnet (Diedrich, 2000). Der Zahnhalteapparat ist bestrebt, die auf den Zahn ausgeübten Kräfte zu dämpfen und zu kompensieren. Dies versucht er über die Eigenelastizität der Zahnhartsubstanz und über eine Streckung der Sharpey'schen Fasern (Diedrich, 2000). Zudem sind die knöchernen Strukturen begrenzt elastisch deformierbar. So kann anfangs die Zahnbewegung ohne einen Gewebumbau kompensiert werden. Die bei der kieferorthopädischen Therapie angewandten Kräfte müssen dosiert eingesetzt werden, um irreversible Schäden im Bereich der Pulpa und des Zahnhalteapparates zu vermeiden. Nach Forschungsergebnissen des Kieferorthopäden Schwarz sollten diese Kräfte den im Desmodont herrschenden kapillaren Blutdruck von 0,15-0,25 N/cm<sup>2</sup> nicht überschreiten (Schwarz 1961; Kahl-Nieke, 2010). Werden diese Werte überschritten, sind irreversible Schäden die Folge, da die Blutzirkulation unterbrochen wird und es zu einer Zerquetschung der parodontalen Weichgewebe kommt. Zwischen dem 6. und dem 18. Tag nach der ersten Kraftapplikation findet die Phase der Zyklusstörung (Hyalinisierung) statt (Diedrich, 2000). Sie kommt nicht regelmäßig vor und sollte durch eine dosierte Kraftapplikation (s.o.) vermieden werden. In dieser Phase kommt die Zahnbewegung zum Stillstand, da die durch Druck beanspruchten Areale wegen des unterbrochenen Blutflusses nekrotisch werden. Mikroskopisch ist diese durch eine hyaline, d.h. eine gläserne Struktur gekennzeichnet, da auf Grund der andauernden Kompression die Zellkerne verschwinden (Diedrich, 2000). In



der letzten Phase ab dem 19. Tag findet wieder die Bewegung der Zähne statt, da ab diesem Zeitpunkt das nekrotische Gewebe abgebaut wird und durch vitales Gewebe ersetzt wird (Diedrich, 2000). Dabei werden die Knochenareale, die sich in der Druckzone befinden, über diverse Signalwege resorbiert.

Auf der entgegengesetzten Seite wird über den Faserapparat ein Zug auf den Knochen ausgeübt. Diese Kräfte stellen eine Wachstumsstimulation für den Knochen dar und bedingen dessen Neubildung (Kahl-Nieke, 2010). Da der Knochenabbau zeitlich schneller als der Knochenaufbau abläuft, bewirkt die Kräftedosierung zugleich eine schonendere Knochenmodellierung und beugt parodontalen Folgeschäden vor. Allerdings können auch pathologische Reize, wie z.B. bakterielle Toxine oder raumfordernde Prozesse (Abszesse, Zysten, Tumore etc.), einen Knochenabbau begründen (Diedrich, 2000).

#### **2.4.2 Die molekularen Abläufe der Knochenmodellierung**

Der Vorgang des Knochenauf- und abbaus basiert auf einer komplexen molekularen Kaskade, in der verschiedene Zellen und Mediatoren involviert sind. Am Knochenaufbau wirken die Osteoblasten mit. Der Knochenabbau wird durch Osteoklasten eingeleitet. Im Zahnhalteapparat sind PDL-Zellen (s. Kapitel 2.2) am Knochenstoffwechsel beteiligt, indem sie Faktoren sezernieren, welche Osteoblasten und Osteoklasten zur Differenzierung anregen.

Ausgangspunkt für die Osteoblastenbildung sind pluripotente Stammzellen. Diese können sich in mehrere spezifische Zelltypen, wie Osteoblasten, Myoblasten, Chondroblasten und Adipozyten differenzieren (Löffler und Petrides, 1997; Katagiri and Takahashi, 2002). Zugkräfte auf den Knochen über diverse Faserapparate sind der physiologische Reiz, der die pluripotenten Stammzellen zur Differenzierung anregt. Diese entwickeln sich über die Stufe der Präosteoblasten (Stammzellen des Knochens) zu den Osteoblasten (Löffler und Petrides, 1997). An der Differenzierung sind die Transkriptionsfaktoren RUNX2 und Osterix beteiligt.

RUNX2 ist ein knochenspezifischer Transkriptionsfaktor mit dem Genlocus 6p21, der als Heterodimer - bestehend aus einer  $\alpha$ -Untereinheit und einer  $\beta$ -Untereinheit - aufgebaut ist. Die  $\alpha$ -Untereinheit kann im Gegensatz zur  $\beta$ -Untereinheit an die DNA binden. Um eine Bindung der  $\beta$ -Untereinheit an die DNA zu ermöglichen, besitzt RUNX2 eine lange Sequenz aus 128 Aminosäuren (Runt-Domäne) (Hofmann und Mitarb., 2009; Lossdörfer und Mitarb., 2009). Diese Bindung erlaubt eine Konformationsänderung des

Proteins und ermöglicht die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen (Lossdörfer und Mitarb., 2009).

Osterix ist ebenfalls ein knochenspezifischer Transkriptionsfaktor, der von Osteoblasten exprimiert wird und an der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen beteiligt ist. Über eine „Zink-Finger-Bindedomäne“, die sich am C-Terminus befindet, bindet dieser an Guanin und Cytosin reiche Sequenzen der DNA (Nakashima et al., 2002). Durch die Bindung von Osterix wird die RNA-Polymerase II an den Transkriptionsstartpunkten der DNA aktiviert. In der Folge werden entsprechende DNA-Abschnitte transkribiert und zur Translation freigegeben (Nakashima et al., 2002). Osteoblasten sind für den Aufbau der Knochen im Gesamtkörper zuständig, aber auch Ausgangspunkt der Osteoklastogenese. Im Alveolarbereich der Kiefer übernehmen PDL-Zellen, welche osteoblastenähnliche Funktionen besitzen, diese Aufgabe und sind maßgeblich am Knochenabbau in dieser Region beteiligt. Nachdem die Osteoklastogenese ausgehend von den Osteoblasten oder den PDL-Zellen vom Ablauf und in Bezug auf die beteiligten Faktoren gleich ist, wird im Folgenden die Differenzierung mit den PDL-Zellen als Ausgangspunkt beschrieben.

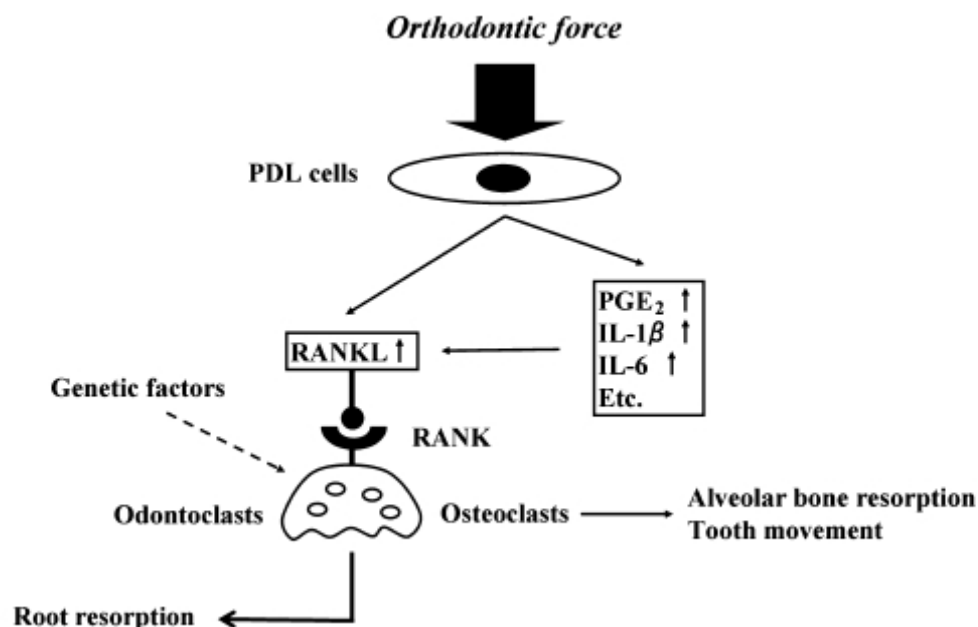


Abb. 10. Schematische Darstellung der Vorgänge im Kieferknochen, ausgehend von orthodontischen Kräften und resultierend im Knochenabbau (aus M. Yamaguchi, 2009).

Knochenabbau wird durch Druckkräfte auf Knochen oder Entzündungsgeschehen induziert. Im Kieferknochen werden Druckkräfte vor allem durch kieferorthopädische Apparaturen aber auch durch schlecht sitzende Prothesen oder raumfordernde, pathologische Prozesse ausgeübt. Diese Kräfte stressen die PDL-Zellen im Zahnhalteapparat und rufen vielfältige zelluläre Reaktionen hervor. An der Differenzierung der Osteoklasten sind mehrere Faktoren des OPG/RANK/RANKL Signalweges beteiligt, darunter Osteoprotegerin (OPG), der Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$  (RANK) und der Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$  Ligand (RANKL) (Katagiri and Takahashi, 2002). Des Weiteren sind mehrere Entzündungsmediatoren wie Interleukine (IL-1 $\beta$ , IL-6) und Prostaglandine von großer Bedeutung für den Vorgang. OPG, RANK und RANKL gehören zur Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF) (Yamaguchi, 2009). OPG und RANKL werden von den Osteoblasten und PDL-Zellen gebildet, RANK wird dagegen von den Osteoklasten exprimiert. Interleukine dagegen zählen zu den Zytokinen (Yamaguchi, 2009). RANKL ist der zentrale Faktor in der Osteoklastogenese. Er ist über Hormone und Zytokine auch direkt an der Knochenresorption beteiligt. OPG und RANK sind beide Rezeptoren von RANKL (Hofbauer und Schoppet, 2006). Osteoprotegerin ist ein Köder-Rezeptor (Decoy-Rezeptor). RANKL bindet an diesen und wird dadurch in seiner Funktion inhibiert. Diese Inhibition verhindert die weitere Differenzierung von den Präosteoklasten zu den reifen Osteoklasten (Hofbauer und Schoppet, 2006). RANK befindet sich auf der Oberfläche der Präosteoklasten. Proinflammatorische Interleukine (va. IL-1 $\beta$  und IL-6) und Prostaglandine (va. Prostaglandin E<sub>2</sub>) werden bei parodontalen Erkrankungen als Entzündungsmediatoren vermehrt ausgeschüttet und wirken verstärkt auf die Produktion von RANKL (Yamaguchi, 2009).

Kieferorthopädische Kräfte oder Entzündungen rufen, ausgehend von den PDL-Zellen im Zahnhalteapparat, eine Aktivierung von Signalkaskaden hervor. Sind dabei Bakterien beteiligt, registrieren die PDL-Zellen deren Lipopolysaccharide über den TLR-4 Rezeptor. Als Reaktion auf das pathogene Geschehen wird der TLR-Signalweg ausgelöst (Vollmar und Dingermann, 2005). Ziel dessen ist der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B. Dieser wandert in den Zellkern der PDL-Zellen und regt die Bildung mehrerer Zytokine an, wie z.B. Interleukin 1 $\beta$  und Interleukin 6. Auch bewirkt er die Aktivierung der Cyclooxygenase 2 (Vollmar und Dingermann, 2005). Die Freisetzung der Entzündungsmediatoren (IL-1 $\beta$ ) (Delima et al., 2002; Graves et al., 2003) und bakterielle Lipopolysaccharide steigern zusätzlich in Makrophagen die Funktion der Cyclooxygenase 2, welche die

Arachidonsäure ( $C_{20}H_{32}O_2$ ) in Prostaglandin  $G_2$  spaltet (Abb. 11). Über die Prostaglandin-E-Synthase wird Prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ ) produziert (Yamaguchi, 2009).

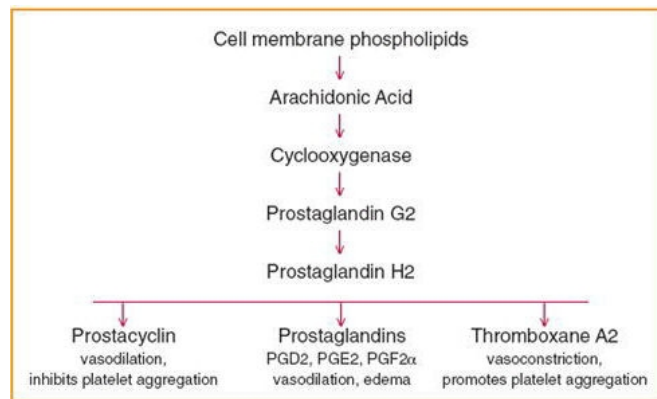


Abb. 11. Arachidonsäurestoffwechsel (aus American Dental Hygienists' Association).

Der erhöhte Spiegel an  $PGE_2$  bewirkt eine Ausschüttung von Interleukin-6 (Yamaguchi, 2009). Diese freigesetzten Mediatoren wandern über die Blutbahn zu den Osteoblasten bzw. PDL-Zellen. Die zweite Wirkung der PDL-Zellen liegt in der Steigerung der RANKL-Synthese. Dazu wird die Transkriptionsrate und die Translationsrate des kodierenden DNA-Abschnitts in der Zelle gesteigert und RANKL gebildet (Yamaguchi, 2009). Somit erhöht sich laufend über zwei unterschiedliche Wege die Konzentration dieses Proteins. Im entzündungs- und druckfreien Zustand wird über PDL-Zellen bzw. Osteoblasten vorwiegend OPG produziert und sezerniert. RANKL hat zu OPG im Gegensatz zum RANK-Rezeptor der Präosteoklasten eine sehr große Affinität (Yamaguchi, 2009). Daher wird das RANKL an OPG gebunden und dadurch die weitere Differenzierung dieser Zellen gehemmt. Auf Grund eines pathologischen Prozesses erfolgt wie o.g. die Steigerung der RANKL Produktion, wodurch sich das RANKL/OPG-Verhältnis ändert (Kanzaki et al., 2001). Durch die stärkere Akkumulation von RANKL bindet dieses auch trotz der niedrigeren Affinität an den RANK-Rezeptor (Yamaguchi, 2009). Auf Grund dieser Veränderung wird die Hemmung der Differenzierung der Präosteoklasten aber auch von Präodontoklasten aufgehoben (Kanzaki et al., 2001; Yamaguchi, 2009). Diese Vorläuferzellen reifen schließlich zu Osteoklasten und Odontoklasten. Die Osteoklasten beginnen direkt mit der Resorption des anliegenden Knochens (Howship-Lakune) (Radlanski, 2011) (Abb. 12 und 13), während die Odontoklasten für die Resorption der Zahnwurzel zuständig sind (Yamaguchi, 2009).

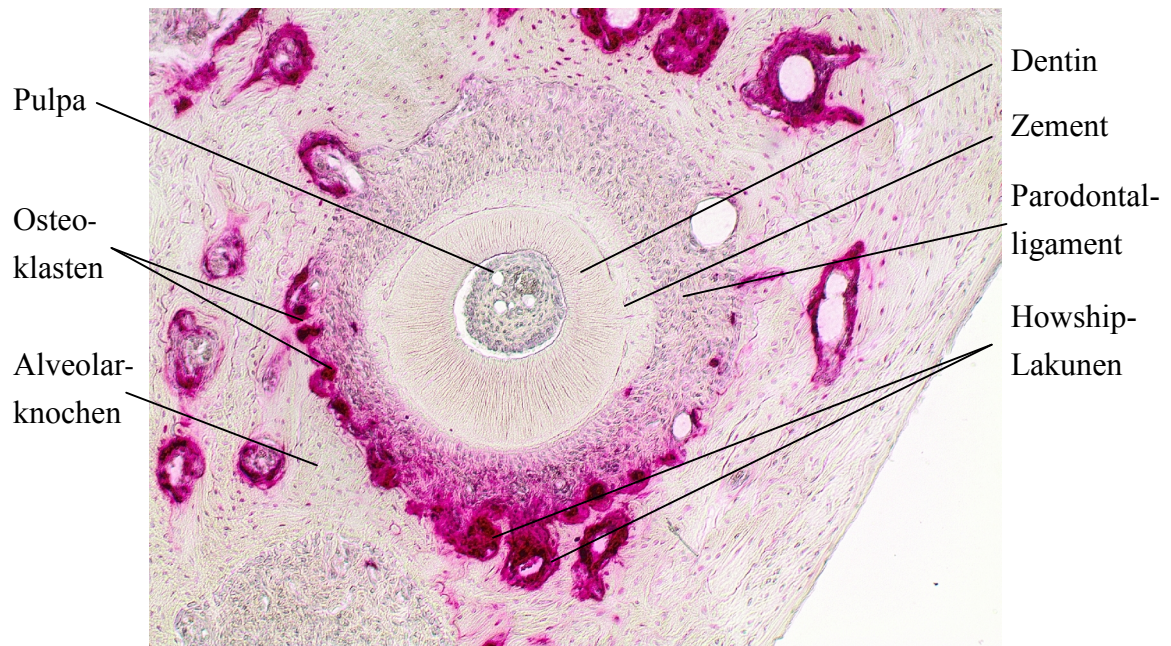


Abb. 12. Mikroskopischer Schnitt durch den Zahn und das Parodont mit eingefärbten Osteoklasten und Howship-Lakunen (TRAP,  $\times 40$ ) (Foto: Dr. P. Römer, Poliklinik für Kieferorthopädie, Universitätsklinikum Regensburg).

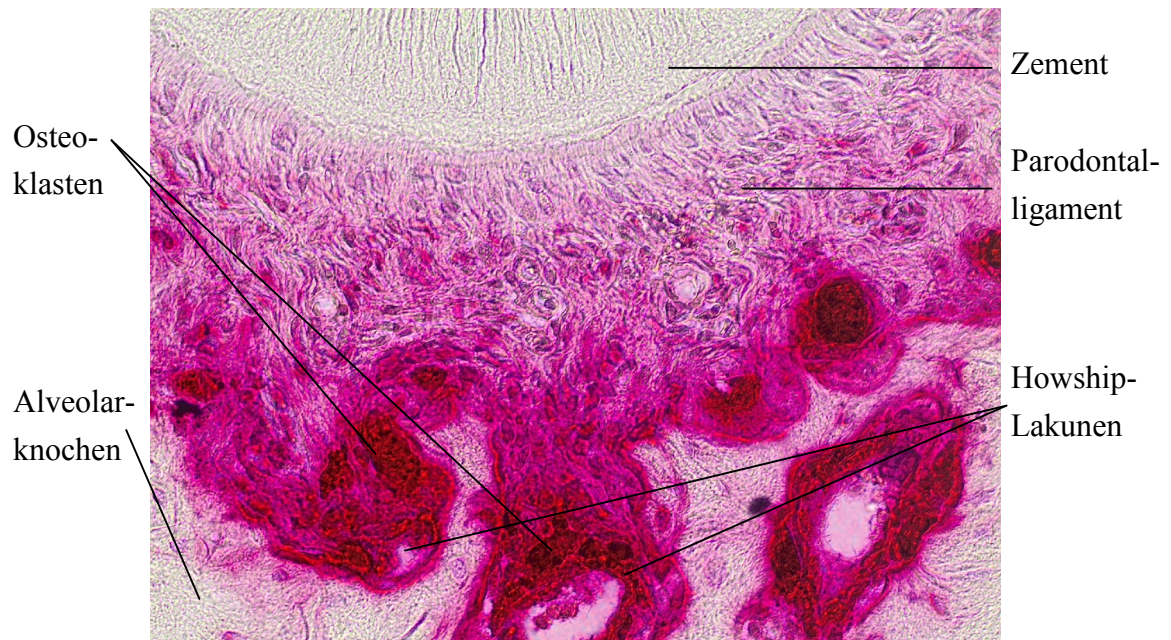


Abb.13. Mikroskopische Aufnahme der eingefärbten Osteoklasten und Howship-Lakunen (TRAP,  $\times 400$ ) (Foto: Dr. P. Römer, Poliklinik für Kieferorthopädie, Universitätsklinikum Regensburg).

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Technisches Zubehör und Verbrauchsmaterialien**

Die Tabelle 1 gibt eine Übersicht über alle verwendeten technischen Zubehöre, Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller.

Tab. 1. Verwendete technische Zubehöre, Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller.

<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>
6/12/24/48-Well-Zellkulturplatten	Sarstedt AG & Co
Autoklav „Systec VX-150“	Systec GmbH
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Binder
Eismaschine „ZBE 30-10“	ZIEGRA Eismaschinen GmbH
ELISA-Platte (96-Well)	BioVendor GmbH
Geldokumentationssystem „Genoplex“	VWR International
Gelelektrophoresesystem	VWR International
Gefrierschrank	Robert Bosch GmbH
Handschuhe	Bio World Medical AG
Kryoröhrchen	Carl Roth GmbH & Co KG
Kühlschrank „Liebherr CN 3556“	Liebherr
Kürette	Aeskulap AG
Luer Zange	Aeskulap AG
Mikroskop „Olympus IX 50“	Olympus Europa Holding GmbH
Pasteur Pipetten (2/5/10/25 ml) (Glas)	VWR International
Pasteur Pipetten (2/5/10/25 ml) (Kunstst.)	Sarstedt AG & Co
Petrischalen	BD Falcon



Pinzetten	Carl Roth GmbH & Co KG
Pipetten „Eppendorf Research Plus“ 0,1-2,5 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten „Eppendorf Research Plus“ 0,5-10 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten „Eppendorf Research Plus“ 2-20 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten „Eppendorf Research Plus“ 10-100 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten „Eppendorf Research Plus“ 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe „Easypet“	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierspitzen (wattiert/unwattiert)	Kisker Biotech GmbH & Co KG
Reaktionsgefäße (0,2/0,5/1/1,5/2 ml)	Kisker Biotech GmbH & Co KG
Reaktionsgefäß (25/50 ml)	Sarstedt AG & Co
Real-Time PCR-Gerät „Eppendorf Realplex“	Eppendorf AG, Hamburg
RT-PCR Abdeckfolie „BZO Seal Film“	Biozym Scientific GmbH
Real-Time PCR Platte (96-Well)	Biozym Scientific GmbH
Real-Time PCR Streicher „P.A. – 1“	3M
Schale	Sarstedt AG & Co
Schüttler	Biometra
Semi-Dry-Blotter	VWR International
Skalpell	Aeskulap AG

Spektrophotometer „GENESYS 10S UV – VIS“	Thermo Scientific
Sterilbank „Hera Safe KS“	Haereus Holding GmbH
Stickstofftank (N <sub>2</sub> -Tank)	Tec Lab GmbH
Thermocycler „Doppio 2.48 well“	VWR International
Vortex „Genie 2“	Scientific Industries Inc. Bohemia NY.
Waage „Kern ABJ“	Kern & Sohn GmbH
Wasserbad	Köttermann
Zellzähler	Beckman Coulter
Zentrifuge „Eppendorf Centrifuge 5804R“	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge „Haereus Fresco 17 Centrifuge“	Haereus Holding GmbH
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Sarstedt AG & Co

### 3.1.2 Chemikalien und Biochemikalien

Die Tabelle 2 gibt eine Übersicht über alle verwendeten Chemikalien und Biochemikalien und über deren Hersteller.

Tab. 2. Verwendete Chemikalien und Biochemikalien und deren Hersteller.

<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>
Acrylamid Mix (30%)	Carl Roth GmbH & Co KG
Agarose	Biozym Scientific GmbH
Antibiotikum/Antimykotikum (AA)	PAA Laboratories GmbH
APS (10%)	Carl Roth GmbH & Co KG
alle Antikörper für den Western-Blot	Antikörper Online GmbH
alle Antikörper für ELISA	BioVendor GmbH
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
c-DNA-KIT	Qiagen



CelLytic™ M Cell Lysis-Reagent	Sigma-Aldrich
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co KG
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
dNTP Mix (10 mM)	Roche
EDTA (0,5 M)	Merck
Eisessig	Carl Roth GmbH & Co KG
Elisa-Kit	BioVendor GmbH
Essigsäure-Lösung (0,2 M)	Merck
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co KG
Fast Red Violet LB Salz	Sigma-Aldrich
Gel Red	BIOTREND Chemikalien GmbH
Glutaraldehyd-Lösung (10%-ig)	Merck
Glycin	Carl Roth GmbH & Co KG
HCl (konz.)	Carl Roth GmbH & Co KG
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co KG
Isoton II (0,8% NaCl)	Beckman Coulter
Kollagenase Typ II	PAA Laboratories GmbH
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH
Methanol	Carl Roth GmbH & Co KG
MMLV Puffer (10×)	Thermo Scientific
Natriumacetat-Lösung (0,2 M)	Merck
NaOCl	Carl Roth GmbH & Co KG
Naphtol Phosphate Disodium Salt	Sigma-Aldrich
Natriumtartrat (0,3 M)	Merck
PBS-Puffer Dulbeccos PBS	PAA Laboratories GmbH
alle Primer für die PCR und RT-PCR	Eurofins MWG Operon

Primer „Oligo-dT <sub>25</sub> “	Fermentas GmbH
Primer „Zufallshexamer“	Fermentas GmbH
Reverse Transkriptase	Biozym Scientific GmbH
RNase Inhibitor	Fermentas GmbH
Roati Load 1 (4×)	Carl Roth GmbH & Co KG
SDS (10%)	Carl Roth GmbH & Co KG
Stripping-Puffer Re-Blot Plus Mild (10×)	Millipore Corporation
Sucrose-Ladepuffer bestehend aus: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 40% Sucrose</li> <li>• 0,05% Bromphenolblau (1%-ig)</li> <li>• 0,05% Xylene-Cyanol (1%-ig)</li> <li>• 59,9% TBE (Tris borate-EDTA)</li> </ul>	Sigma-Aldrich
SybrGreen Jump Start Taq Ready Mix	Sigma-Aldrich
Taq-Polymerase	Biomol GmbH
TEMED	Carl Roth GmbH & Co KG
Tris (1,0 M; 1,5 M; div. pH Werte)	USB
TRI – Reagent „peqGOLD TriFast“	Peqlab Biotechnologie GmbH
Triton® X-100	Sigma-Aldrich
Trypsin – EDTA	PAA Laboratories GmbH
Tween 20	Sigma-Aldrich
Vitamin C	PAA Laboratories GmbH
Vollmedium DMEM High Glucose (4,5 g/l) + 10% Fötales Kälberserum (FCS) + 1% Antibiotikum/Antimykotikum (AA) + 1% L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH

### **3.2 Patientenauswahl**

Die Auswahl der Patienten erfolgte in der Poliklinik für Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie (Direktor: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert) des Universitätsklinikums Regensburg. Dabei wurden männliche und weibliche Patienten im Alter zwischen 14 und 22 Jahren ausgewählt, bei denen aufgrund medizinischer Indikation die Zähne extrahiert werden mussten. Dabei durften diese Zähne weder parodontale noch kariöse Läsionen aufweisen. Die Patienten wurden über die Verwendung der Zähne zu Forschungszwecken aufgeklärt und zeigten sich damit einverstanden. Zusätzlich wurde der Versuch von der zuständigen Ethikkommission geprüft und genehmigt.

### **3.3 Vorbereitende Maßnahmen für die *in vitro* Versuchsreihe**

Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden unter einer Sterilbank mit Schutzhandschuhen durchgeführt. Dabei verwendete Geräte, Instrumente und Flüssigkeiten wurden vorher gründlich sterilisiert. Die gewonnenen PDL-Zellen wurden immer in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### **3.3.1 Isolation der PDL-Zellen**

Die extrahierten Weisheitszähne wurden für die Zeit (max. 1 h) bis zur Isolation der PDL-Zellen in einem sterilen, serumfreien Vollmedium in einem 50 ml Reaktionsgefäß bei einer Temperatur von 4°C aufbewahrt. Dieses Vollmedium besteht aus DMEM High Glucose, der zusätzlich 1% Antibiotikum/Antimykotikum (AA) und 1% L-Glutamin zugegeben wurden.

Die Zähne wurden aus dem Reaktionsgefäß entnommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gelegt, welches mit PBS und AA gefüllt ist. Sie wurden viermal mit PBS und AA gewaschen, um vorhandene Keime abzuwaschen und Blutreste zu entfernen. Die Zähne wurden zur Ablösung des parodontalen Ligaments in eine mit PBS und AA gefüllte Schale gelegt. Das parodontale Ligament wurde mittels Skalpell, Kürette und Pinzette aus dem mittleren und unteren Drittel des Zahnes vorsichtig abgeschabt (Abb. 14) und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Diese Stückchen wurden mit PBS und AA gewaschen und sedimentierten anschließend. Dieser Vorgang wurde insgesamt viermal wiederholt. Kleinere Gewebestückchen, die nicht von selbst sedimentieren konnten, wurden 5 min bei 1.200 U/min zentrifugiert.

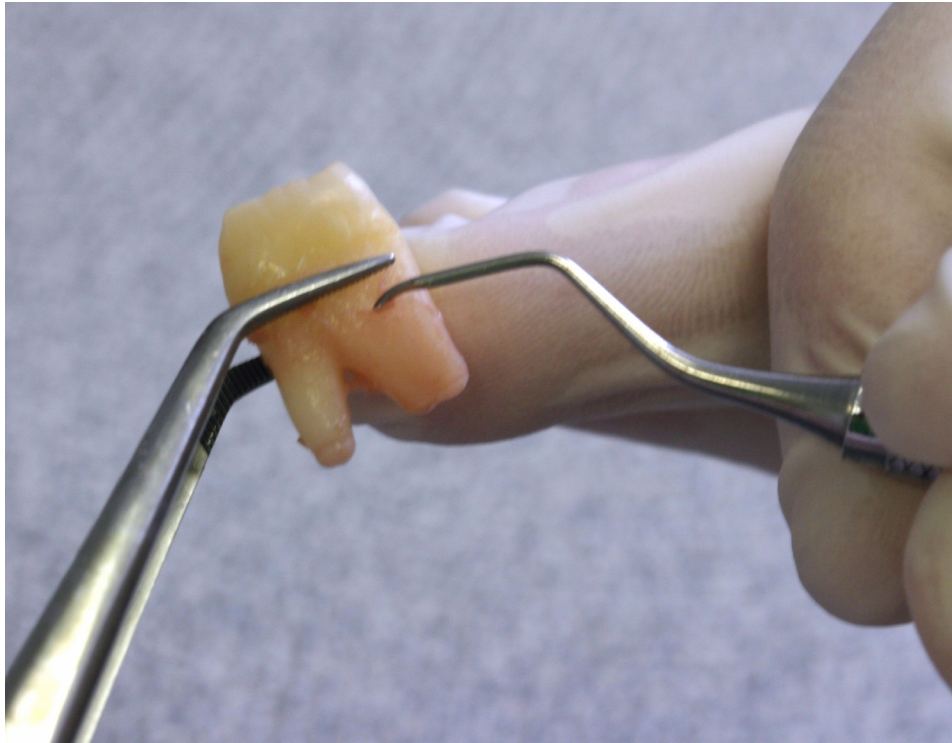


Abb. 14. Abschaben des parodontalen Ligaments mittels einer Kürette.

Nach dieser Zeit wurde der Überstand abgenommen und ein Kollagenase-Verdau durchgeführt. Dabei wurde zu den Ligamentfragmenten 180  $\mu$ l Kollagenase Typ III und 5 ml serumfreies Medium hinzugegeben, um die PDL-Zellen aus dem Gewebeverband zu isolieren. Anschließend wurde der Ansatz 20 min bei 37°C auf einem Schüttler in einem Wasserbad inkubiert.

Nach der Inkubation wurde wiederum 5 min bei 1.200 U/min zentrifugiert und danach der Überstand abgenommen. Die isolierten Zellen wurden in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und in jedes verwendete Well 2 ml Vollmedium aus DMEM High Glucose zupipettiert. Mikroskopisch erfolgte nochmals eine Kontrolle der Aussaat. Die Zellen wurden 7 Tage im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Erst nach dieser Zeit erfolgte der erste Wechsel des Mediums. Das Wachstum der PDL-Zellen wurde täglich mikroskopisch kontrolliert (Abb. 15). Dabei wurde ebenfalls das unerwünschte Wachstum von Hefezellen, Bakterien und Pilzen ausgeschlossen. Nach der ersten Woche wurde dreimal wöchentlich das Medium gewechselt, um den Zellen optimale Wachstumsbedingungen zu bieten. Zudem erfolgte durch das kontinuierliche Zellwachstum die Passagierung und weitere Kultivierung der PDL-Zellen.

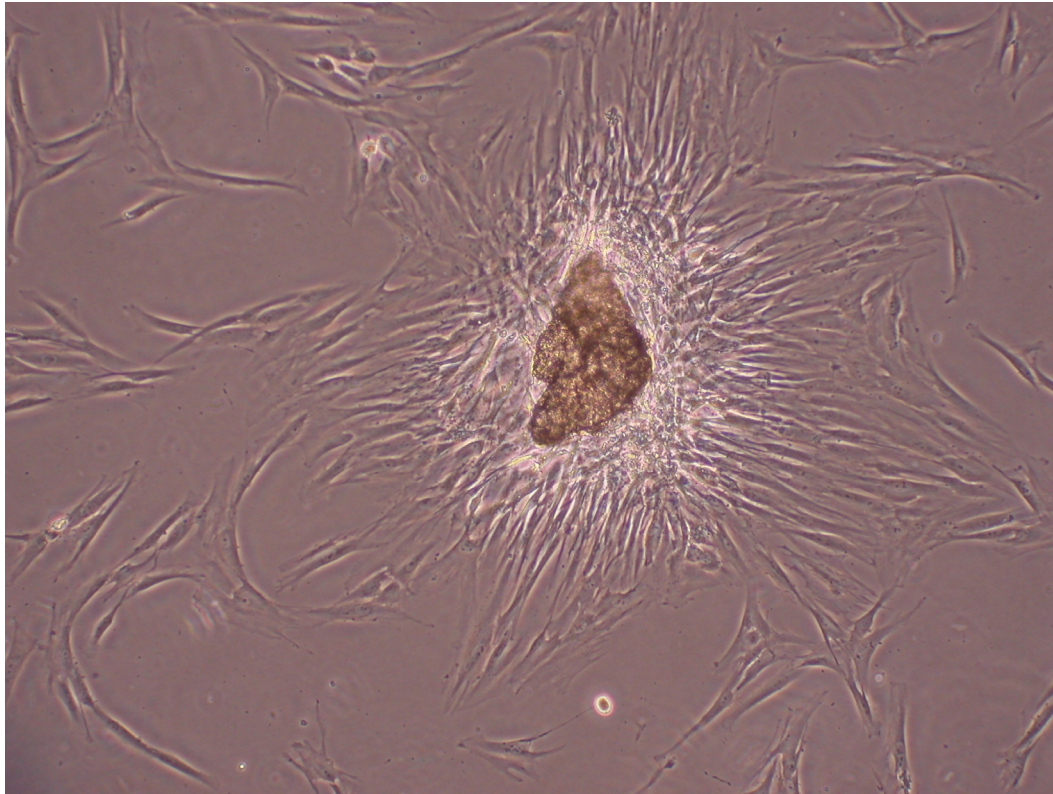


Abb. 15. Auswachsende PDL-Zellen (spindelförmig) aus einem Wurzelhautfragment (braun) ( $\times 100$ ).

### 3.3.2 Nachweis der PDL-Zellen

Bei der Ablösung des parodontalen Ligaments besteht die Gefahr, auch andere Zellen des Zahnhalteapparats zu isolieren und diese nun zu kultivieren. Die eindeutige Identifikation ist daher ein wichtiger Schritt, um einen Fehler in den vorangegangenen Arbeitsschritten auszuschließen. PDL-Zellen können anhand zweier Merkmale nachgewiesen werden:

1. Morphologie
2. Genexpression

Die Beurteilung nach dem erstgenannten Merkmal erfolgte unter dem Lichtmikroskop. PDL-Zellen besitzen wie bereits in Kapitel 2.2 beschrieben eine spindelförmige Morphologie und konnten anhand dieser erkannt werden. Die genaue Identifikation erfolgte durch die Messung der Genexpression der Zellen mittels einer PCR. Bevor eine PCR durchgeführt werden kann, muss die RNA der Zellen isoliert werden und daraus eine c-DNA (complementary-DNA) hergestellt werden.

### **3.3.2.1 Isolierung der RNA**

In einem ersten Schritt waren die Zellen mit PBS-Puffer zu waschen. In jedes Well der Zellkulturplatte wurde 1 ml TRI-Reagent zupipettiert und der ganze Ansatz 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zugabe des TRI-Reagent bewirkte die Lyse der Zellen und inaktivierte zusätzlich das Enzym RNase. Der Wellinhalt wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform erfolgte 15 sec lang eine gute Durchmischung mit Hilfe des Vortex, bis sich ein trüber Niederschlag gebildet hatte. Nach einer Stehzeit von 5 bis 10 min und anschließender Zentrifugation für weitere 10 min bei 4°C und 14.000 U/min kam es zur Trennung der Phasen in eine organische und eine wässrige Phase. Letztere war die obere Phase und enthielt die Gesamt-RNA. Die untere organische Phase enthielt Proteine und Zellmembranbestandteile.

Der klare, wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die organische Phase wurde in dem Reaktionsgefäß belassen und im Gefrierschrank bei – 80 °C eingefroren. Durch Zugabe von 400 µl Isopropanol (99,8%) zur wässrigen Phase sollte die RNA ausfallen. Diese Mischung wurde wiederum 15 sec mit dem Vortex gut durchmengt. Nachdem der Inhalt erneut 10 min bei Raumtemperatur inkubiert worden war, erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 14.000 U/min. Dadurch sedimentierte die RNA und war als kleines, weißes Pellet sichtbar. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Zu dem RNA-Pellet wurde 1 ml Ethanol (70%) zugeführt und der Inhalt nochmals 15 sec mit dem Vortex gut durchmischt. Der Ansatz wurde bei 4°C und 7.500 U/min für 5 min zentrifugiert. Die Ethanolzugabe und die Zentrifugation wurden im Anschluss ein zweites Mal durchgeführt. Der Überstand wurde danach wiederum verworfen. Anschließend erfolgte das Trocknen des RNA-Pellets für 5 bis 10 min bei Raumtemperatur. Dieses wurde in 25 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und sofort auf Eis gekühlt.

### **3.3.2.2 Synthese der c-DNA**

Für die Quantifizierung der RNA wurde die Absorbanz der nukleinsäurehaltigen Flüssigkeit bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Aus diesem Wert ließ sich die tatsächliche RNA-Konzentration in ng/µl ermitteln. Die c-DNA wurde anschließend mittels reverser Transkription aus der RNA erzeugt. Die c-DNA-Synthese aus der Gesamt-RNA erfolgte nach folgendem Schema:

- 1 µg RNA
- 1 µl Oligo-dT<sub>25</sub>-Primer (10 pmol/µl)
- 1 µl Zufallshexamerprimer (10 pmol/µl)
- 2 µl 10× Reaktionspuffer
- 1 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 1 µl RNase-Inhibitor
- 200 U MMLV-RTase (Reverse Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus)
- ad 20 µl mit DEPC-Wasser auffüllen

Tab. 3. Basensequenzen der Primer für die c-DNA-Synthese.

Name	Basensequenz (5→3)
Oligo-dT <sub>25</sub>	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
Zufallshexamer	NNNNNN (N= G, A, T, C)

Um die Proben auf Verunreinigungen zu untersuchen, wurde vor der Inkubation noch eine „Minus Reverse Transkriptase Kontrolle“ angefertigt. Hierzu wurden in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß 1 µg RNA und 2 µl 10× MMLV-Puffer pipettiert und auf ein Gesamtvolumen von 20 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Zur Synthese der c-DNA inkubierte man die Proben für 60 min bei 42°C wiederum im Thermocycler.

### 3.3.2.3 Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient zur Amplifizierung ausgewählter Abschnitte der hergestellten c-DNA (Löffler und Petrides, 1997). Mit Hilfe geeigneter Oligonukleotide werden für PDL-Zellen charakteristische Abschnitte vervielfältigt.

Für die PCR wurde ein Gesamtansatz in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß mit einem Gesamtvolumen von 20 µl aus mehreren Komponenten hergestellt:

- 14,4 µl H<sub>2</sub>O
- 2 µl c-DNA (10× verdünnt)
- 2 µl 10× MgCl<sub>2</sub>-Puffer

- je 5 pmol eines Sense- und Antisense-Oligo-Primer-Mix
- 0,4 µl dNTP (Konzentration: 200 µM)
- 0,2 µl (1 U) Taq-Polymerase (5 U/µl)

Die Sense- und Antisense Primer waren jeweils für ein bestimmtes Gen spezifisch. Zur Identifizierung der PDL-Zellen wurden die Gene Alkalische Phosphatase (ALP) (NM\_000478), Bone Sialoprotein (BSP) (NM\_004967), Fibromodulin (NM\_002023), Osteoprotegerin (OPG) (NM\_002546.3), Periostin (NM\_001135934.1), RANKL (AF019047) und RUNX2 (NM\_001015051.3) untersucht (Tab. 4). Zur Identifikation der für die PDL-Zellen charakteristischen Gene galt es mehrere Ansätze herzustellen.

Tab. 4. Sequenzen und Ampliconlängen der verwendeten Primer für die PCR.

Name	Primer A (5→3)	Primer B (5→3)	Ampliconlänge
Alkalische Phosphatase	AGAACCCCAAAGG-CTTCTTC	CTTGGCTTTTCCTT-CATGGT	74 bp
Bone Sialoprotein	CAATCTGTGCCACT-CACTGC	CAGTCTTCATTTTG-GTGATTGC	80 bp
Fibromodulin	GGGACGTGGTCAC-TCTCTG	CTGGGAGAGGGAG-AAGAGC	93 bp
Osteoprotegerin	GAAGGGCGCTACCT-TGAGAT	GCAAACGTGATTT-CGCTCTGG	102 bp
Periostin	GAACCAAAAATTA-AAGTGATTGAAGG	TGACTTTTGTTAGT-GTGGGTCCT	76 bp
RANKL	TGATTCATGTAGGA-GAATTAAACAGG	GATGTGCTGTGAT-CCAACGA	82 bp
RUNX2	GTGCCTAGGCGCAT-TTCA	GCTCTTCTTACTGA-GAGTGGAAGG	78 bp

Nach der Herstellung der Ansätze wurden diese in den Heizblock eines Thermocyclers eingeführt. Das PCR-Programm wurde nach folgendem Schema gestartet (Tab. 5):



Tab. 5. Ablauf der PCR.

Schritt	Dauer	Temperatur	Anzahl
Aufheizen	5 min	95°C	1×
Denaturierung	20 sec	95°C	40×
Hybridisierung	20 sec	60°C	
Elongation	20 sec	72°C	

### 3.3.2.4 Die Agarose-Gelelektrophorese

Die mit der PCR amplifizierten DNA-Abschnitte wurden durch eine Agarose-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dabei verfügt das Agarosegel über eine netzförmige Struktur, durch welche die Nukleinsäuren bei angelegter Spannung wandern müssen (Löffler und Petrides, 1997). DNA-Moleküle mit kleinerem Molekulargewicht können das Gel schneller durchwandern als DNA-Moleküle mit höherem Molekulargewicht. Über einen interkalierenden und fluoreszierenden Farbstoff können die Banden der gewanderten DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden.

Initial wurde ein Agarosegel in einem 500 ml Glasgefäß mit einer Konzentration von 1,5% hergestellt. Dafür wurden 1,5 g Agarose in 100 ml eigens angemischtem 1× Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer; Herstellung s. Tab. 6) gelöst.

Tab. 6. Bestandteile und Herstellung eines 1× Tris-Acetat-EDTA-Puffers.

Bestandteile	Menge für 50× TAE-Puffer-Lösung
Tris	242 g
Eisessig	57,1 ml
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	100 ml
mit dest. H <sub>2</sub> O auf ein Volumen von 1.000 ml auffüllen	
Für 1× TAE-Puffer-Lösung: 20 ml TAE (50×) + 980 ml dest. H <sub>2</sub> O	

Nach dem Aufkochen des Ansatzes wurden 6 µl von dem fluoreszierenden Farbstoff Gel Red zugegeben, der sich interkalierend in die DNA einlagert. Das Agarosegel wurde in eine 11 cm × 14 cm große Gelelektrophoresekammer eingefüllt und abgekühlt. Dabei war ein 12-fach Kamm eingebracht, der zwölf nebeneinander liegende Bereiche

aussparte. Nach der Abkühlung wurden 7 µl des jeweiligen PCR-Produktes und 3 µl des Sucrose-Ladepuffers in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß vermengt. Der Inhalt des Gefäßes wurde in die ausgesparten Taschen des Agarosegels pipettiert. Als Laufpuffer wurde 1× TAE-Puffer verwendet. Nach Anlegen einer Spannung von 120 V für 40 min wurden die PCR-Produkte mit dem Geldokumentationssystem auf Grund der Fluoreszenz sichtbar gemacht.

Das Molekulargewicht der jeweiligen Gene konnte zur Identifizierung der PDL-Zellen mittels einer Standardkontrolle abgeschätzt werden.

### 3.3.3 Passagieren, Trypsinieren und Kultivieren der PDL-Zellen

Um ein weiteres Wachstum zu erreichen, mussten die PDL-Zellen nach deren Identifizierung passagiert werden. Voraussetzung für die Passagierung war nach mikroskopischer Kontrolle ein konfluenter, einschichtiger Zellrasen. Die Passagenzahl erhöhte sich dabei immer um die Zahl eins. Im vorliegenden Experiment wurden die Zellen bis zur Passage 5 nach dem Protokoll in Tab. 7 behandelt.

Tab. 7. Protokoll zur Passagierung der Zellen.

Nummer	Arbeitsschritt
1	Absaugen des Nährmediums und Waschen der Zellen mit PBS
2	Lösen der Zellkontakte mit 1 ml Trypsin/Well
3	Inkubation für 4 min bei 37°C im CO <sub>2</sub> -Inkubator
4	Zugabe von 2 ml Nährmedium zur Inhibierung des Trypsins
5	Überführung in 25 ml Reaktionsgefäß
6	Sedimentierung der Zellen durch Zentrifugation bei 1.200 U/min für 5 min
7	Absaugen des Überstands und Rekultivierung der Zellenpellets mit 4 ml Vollmedium in den Zellkulturplatten
8	Bestimmung der Zellzahl mittels des Zellzählers „Beckman Coulter Counter Z2“ (s. Kap. 3.3.4)

Die kultivierten PDL-Zellen wurden jeden Tag lichtmikroskopisch im Hinblick auf Wachstum und Kultivierung überprüft. Dreimal pro Woche wurde ein Wechsel des Vollmediums durchgeführt, um den Zellen optimale Lebensbedingungen zu bieten. Die ab Passage 3 nicht mehr benötigten Zellen wurden eingefroren, um sie für spätere Experimente zu erhalten. Für die Konservierung der Zellen wurde der Zellsuspension 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) beigemischt. Der Ansatz wurde in Kryoröhrchen pipettiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Am folgenden Tag wurden diese in den  $\text{N}_2$ -Tank überführt.

### 3.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Messung der Zellzahl erfolgte mittels des Zellzählers „Beckman Coulter Counter Z2“ und wurde mit nachfolgendem Protokoll (Tab. 8) durchgeführt.

Tab. 8. Protokoll zur Bestimmung der Zellzahl.

Nummer	Arbeitsschritt
1	Abfüllen von 10 ml Isoton-II in ein Plastik-Messgefäß
2	Zupipetieren von 100 $\mu\text{l}$ der Zellsuspension und gleichmäßige Vermischung durch mehrmaliges Schwenken
3	Leerwertmessung mit dem Zellzähler von Isoton-II nach Herstellerangaben (darf max. 1% der ermittelten Zellzahl/ml betragen)
4	Bestimmung der Zellzahl in den Wells (Zellzahl/ml)
5	In den Versuchen sollten sich in jedem Well 70.000 Zellen befinden. Berechnung des benötigten Volumens an Zellsuspension für die gewünschten 70.000 Zellen
6	Aussaat und Rekultivierung der Zellen

### 3.4 Simulation kieferorthopädischer Kräfte und Stimulation mit parodontal-pathogenen Keimen

#### 3.4.1 Der Versuchsaufbau

Für das Experiment waren vier Zellkulturplatten mit je 6-Well vorbereitet. In jedes Well wurden gleichermaßen 70.000 Zellen ausgesät und jeweils 2 ml Vollmedium zupipettiert. Im Anschluss ließ man die Zellen bis zu einer Konfluenz von 70% wachsen. Der Versuchsaufbau sah vier verschiedene Gruppen vor (Abb. 16):

Gruppe 1: Kontrollgruppe ohne Druck, ohne parodontal-pathogene Keime

Gruppe 2: Gruppe mit Druck ( $2 \text{ g/cm}^2$ ), ohne parodontal-pathogene Keime

Gruppe 3: Kontrollgruppe ohne Druck, mit  $2 \times 10^7$  parodontal-pathogenen Keimen

Gruppe 4: Gruppe mit Druck ( $2 \text{ g/cm}^2$ ), mit  $2 \times 10^7$  parodontal-pathogenen Keimen

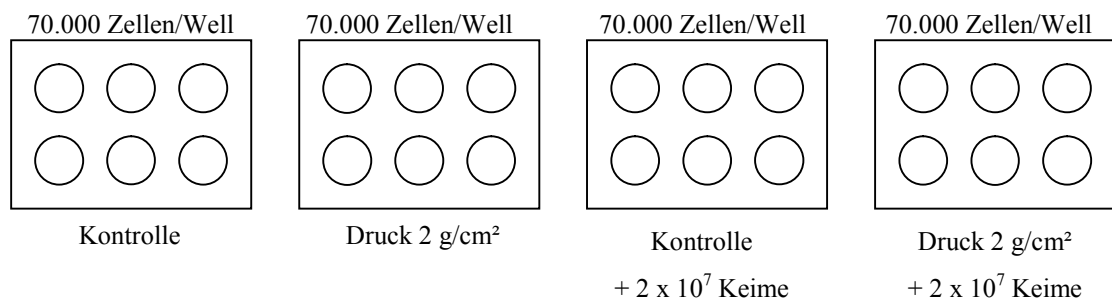


Abb. 16. Die vier verschiedenen Gruppen des Druckexperimentes.

Der Druck von  $2 \text{ g/cm}^2$  wurde kontinuierlich nach der Methode von Kanzaki et al. (2002) 96 h mittels Glaszylindern ausgeübt, welche eine Dicke von 7,8 mm, einen Durchmesser von 33 mm und eine Masse von 17,44 g aufwiesen (Abb. 17).

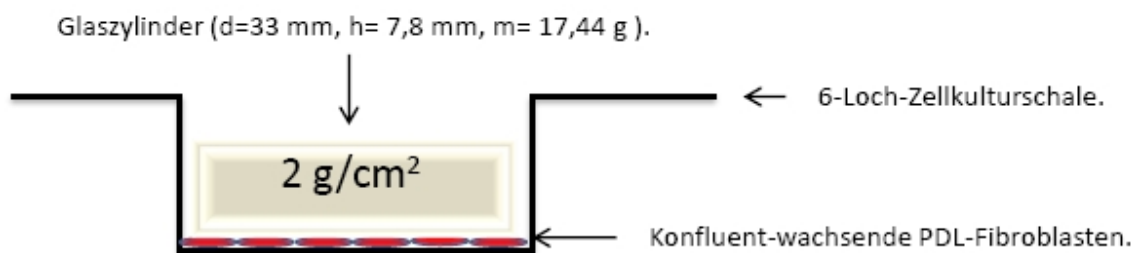


Abb. 17. Versuchsaufbau der mit Kraftapplikation behandelten Gruppe.

Als Bakterien wurden die hitzeinaktivierten parodontal-pathogenen Keime *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (DSM 11123) und *Fusobacterium nucleatum* (DSM 15643) verwendet. Die Bakterien wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene (Direktor: Prof. Dr. Dr. André Gessner) des Universitätsklinikums Regensburg durch Herrn Dr. Josef Köstler nach der Methode von Sun et al. (2010) kultiviert und gezüchtet. Die Bakterienanzahl bestimmte dieser über die Optische Dichte (OD) mittels eines Spektrophotometers bei einer Wellenlänge von 690 nm. Eine OD<sub>690 nm</sub> entsprach ca.  $1 \times 10^8$  Bakterienzellen/ml (Sun et al., 2010).

### **3.4.2 Die Versuchsdurchführung**

Nach Erreichen der 70%igen Konfluenz begann die Durchführung des Experimentes. Für die dem Druck ausgesetzten Gruppen wurde die entsprechende Anzahl an Glaszylindern für 2 h bei 250°C im Trockenschrank sterilisiert. In der Zwischenzeit wurde für die Versuchsgruppen mit Bakterienzusatz ein Gesamtansatz vorbereitet, der aus 90% Vollmedium und 10% *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*/*Fusobacterium nucleatum* bestand. Dem Vollmedium war bei jeder nachfolgend beschriebenen Verwendung Vitamin C zugesetzt. Jedes dieser Wells mit Bakterienzusatz sollte mit 1.800 µl Vollmedium und 200 µl Bakterien (entspricht ca.  $2 \times 10^7$  Bakterienzellen) befüllt werden. In die Wells ohne Bakterienzusatz sollte 2.000 µl (2 ml) Vollmedium zupipettiert werden. Die entsprechende Anzahl an Glaszylindern wurde nach deren Sterilisation für mindestens 15 min in eine mit Vollmedium gefüllte Petrischale gelegt. Dadurch wurde die Sättigung der Oberfläche mit Proteinen sichergestellt und eine spätere Ernährung der PDL-Zellen unter dem Glaszylinder garantiert.

Nach Entnahme der vier 6-Well-Platten aus dem CO<sub>2</sub>-Inkubator wurde mit dem Lichtmikroskop nochmals die Konfluenz überprüft. Nach erfolgter Kontrolle wurde aus jedem Well das alte Vollmedium abgesaugt und verworfen. Jede Platte wurde nun einer Versuchsgruppe zugeordnet, beschriftet und wie in den Abbildungen 16 und 17 sichtbar befüllt.

Alle vier Versuchsgruppen wurden für 96 Stunden bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert, um deutliche Änderungen in der Genexpression der PDL-Zellen zu provozieren.

## **3.5 Untersuchungsmethoden**

### **3.5.1 Bestimmung der Genexpression mittels Real-Time PCR**

#### **3.5.1.1 Durchführung**

Nach dem Experiment wurde pro Well 1 ml Überstand mit einer Pipette in ein neues 1 ml Reaktionsgefäß überführt. Diese wurden in flüssigem Stickstoff (N<sub>2</sub>) schockgefroren und dann bei – 80°C im Tiefkühlschrank bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die adhärent gewachsenen Zellen wurden mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit dem TRI-Reagent lysiert und die Gesamt-RNA nach Herstellerangaben aufgereinigt. Daraus wurde die c-DNA nach Herstellerangaben synthetisiert. Nach deren Bildung wurde für jedes Well und jedes untersuchte Gen ein spezieller Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 15 µl in eine 96-Well-RT-PCR-Platte zur Durchführung einer Real-Time PCR pipettiert, um die Genexpression zu quantifizieren (Holzapfel und Wickert, 2007):

- 5,25 µl H<sub>2</sub>O
- 7,5 µl SybrGreen Jump Start Taq Ready Mix
- 0,375 µl Forward-Primer (10 pmol/µl)
- 0,375 µl Reverse-Primer (10 pmol/µl)
- 1,5 µl c-DNA (10× verdünnt)

Dabei wurde für jede c-DNA und jedes untersuchte Gen der Ansatz dreimal pipettiert, um Verunreinigungen zu erkennen und zu eliminieren. Es wurden die Gene RNA-Polymerase (NM\_000937.3), OPG (NM\_002546.3) und RANKL (AF019047) untersucht.

Für die RT-PCR wurden jeweils zwei intronübergreifende Primer pro untersuchtem Gen verwendet, um die Amplifizierung genomischer DNA zu verhindern. Der erste Primer war ein „Forward Primer“, der zweite ein „Reverse Primer“ (Tab. 9). Die Auswahl der Primer für die RT-PCR erfolgte mittels des Online-Programms ProbeLibrary Assay Design Center der Fa. Roche (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=UP030000>).

Tab. 9. Sequenzen und Ampliconlängen der verwendeten Primer für die RT-PCR.

Name	Forward Primer (5→3)	Reverse Primer (5→3)	Ampliconlänge
RNA Polyme- rase	TTGTGCAGGACACA- CTCACA	CAGGAGGTTCATC- ACTTCACC	83 bp
Osteoprote- gerin	GAAGGGCGCTACCT- TGAGAT	GCAAACGTGATTT- CGCTCTGG	102 bp
RANKL	TGATTCATGTAGGA- GAATTAAACAGG	GATGTGCTGTGAT- CCAACGA	82 bp

Bei dem SybrGreen Jump Start Taq Ready Mix handelt es sich um einen fluoreszierenden Farbstoff, der sich in dem kleinen Spaltraum der doppelsträngigen DNA einlagert (Holzapfel und Wickert, 2007). Die Fluoreszenz wird bei der RT-PCR im Gegensatz zu anderen PCR-Methoden laufend am Ende der Elongation bestimmt und ausgewertet (Holzapfel und Wickert, 2007). Der Komplex aus DNA und SybrGreen I absorbiert Licht bei einer Wellenlänge  $\lambda_{\text{max}} = 494 \text{ nm}$  und emittiert Licht bei einer Wellenlänge  $\lambda_{\text{max}} = 521 \text{ nm}$ . Die Fluoreszenz verhält sich direkt proportional zur Konzentration der complementary-DNA, die bei der RT-PCR in jedem Zyklus neu synthetisiert wird (Holzapfel und Wickert, 2007). Es ist jedoch immer eine Hintergrundfluoreszenz vorhanden. Deshalb wird dem  $C_T$ -Wert („Threshold Cycle“= „Schwellenwertzyklus“) eine besondere Bedeutung beigemessen. Dieser Wert gibt die Zykluszahl der RT-PCR an, bei dem die Fluoreszenz nachweisbar die stetige Hintergrundfluoreszenz übersteigt (Holzapfel und Wickert, 2007).

Abschließend wurde die 96-Well-RT-PCR-Platte mit einer Folie dicht verschlossen und in den Thermocycler eingelegt.

Die Rahmenbedingungen wurden nach Herstellerangaben in das zugehörige PC-Programm („Mastercycler® ep realplex“) der Firma Eppendorf eingegeben. Dazu gehörte eine detaillierte Beschriftung der einzelnen Wells (Abb. 18). Die RNA-Polymerase (NM\_000937.3) wurde für die PCR-Amplifizierung als Referenzgen („house keeping gene“) festgelegt, da es sich bei diesem um ein nicht reguliertes Gen handelt, welches unabhängig von äußeren Einflüssen stets gleichmäßig exprimiert wird. OPG (NM\_002546.3) und RANKL (AF019047) waren die Zielgene („target genes“).

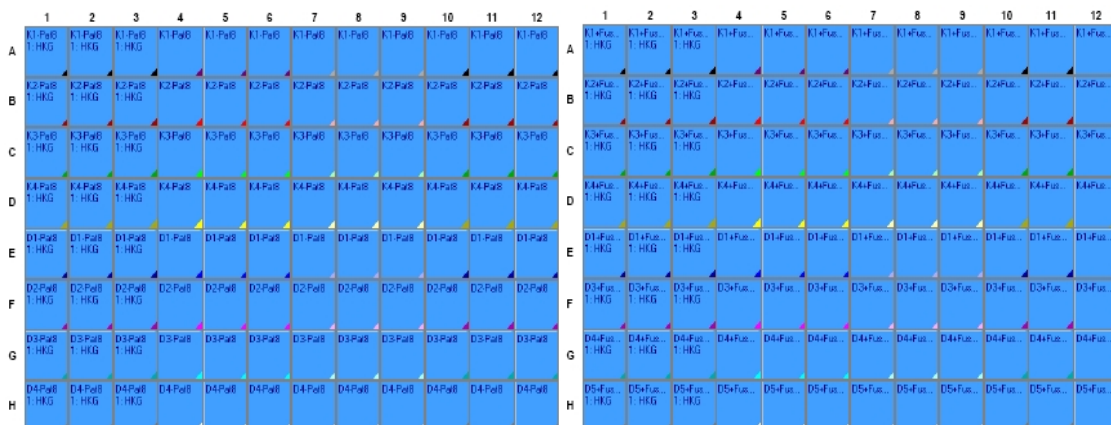


Abb. 18. Layout der PCR-Platten im PC für die versch. Versuchsgruppen.

Der Ablauf der PCR war folgendermaßen aufgebaut (Abb. 19):

1. Aufheizen und initiale Denaturierung der DNA bei 95°C für 5 min
2. Denaturierung der DNA bei 95°C für 10 sec
3. Annealing (Anlagerung) der Primer bei 60°C für 8 sec
4. Elongation und Messung der Fluoreszenz bei 72°C für 8 sec

Die Zyklen 2 bis 4 wurden 45-mal wiederholt. Letztlich erfolgte die Aufnahme einer Schmelzkurve („melting curve“) zum Nachweis der Primerspezifität. Dabei wird die DNA durch langsame kontinuierliche Temperatursteigerung aufgeschmolzen. Guanin-Cytosin Basenpaare besitzen wegen der drei Wasserstoffbrückenbindungen einen höheren Schmelzpunkt als Adenin-Thymin-Basenpaare (zwei Wasserstoffbrückenbindungen). Diese Eigenschaft bedingt unterschiedliche Schmelztemperaturen bei den DNA-Fragmenten und ermöglicht deren Unterscheidung (Holzapfel und Wickert, 2007). Die Schmelzkurvenanalyse bestand ebenfalls aus 4 Schritten (Abb. 19):

1. Initiale Denaturierung bei 95°C für 15 sec
2. Annealing der Primer bei 60°C für 15 sec
3. kontinuierliche Temperaturerhöhung von 60°C auf 95°C innerhalb von 20 min mit laufender Messung der Fluoreszenz
4. Halten der Temperatur von 95°C für 15 sec und Abschluss der RT-PCR



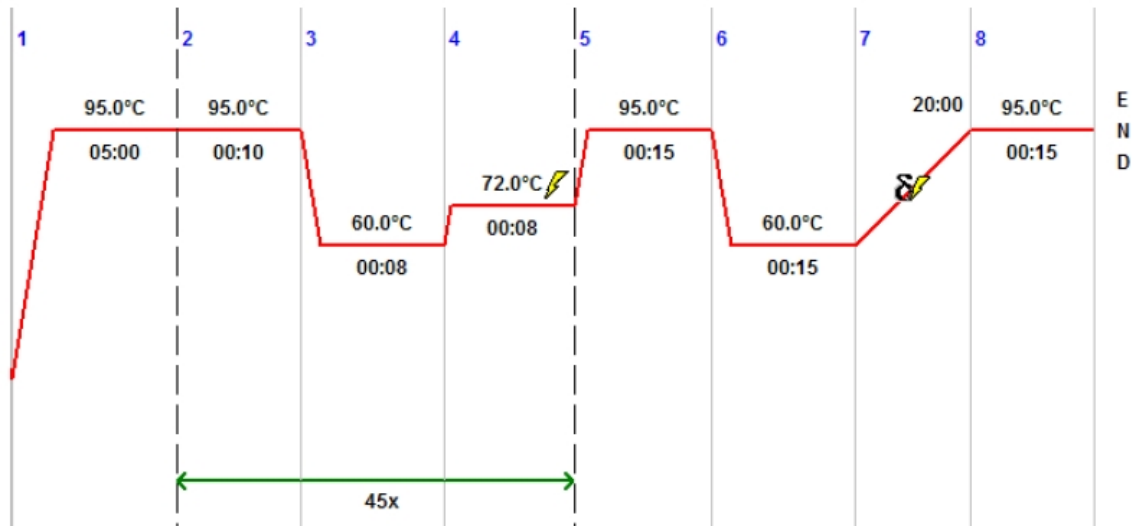


Abb. 19. Ablauf der Real-Time-PCR.

### 3.5.1.2 Bestimmung der Genexpression

Nach Beendigung der RT-PCR wurden die Ergebnisse durch das PC Programm graphisch (Abb. 20) und tabellarisch dargestellt. Daraus wurden die jeweiligen  $C_T$ -Werte der einzelnen Proben bei einem eingestellten Fluoreszenzschwellenwert (991) ermittelt.

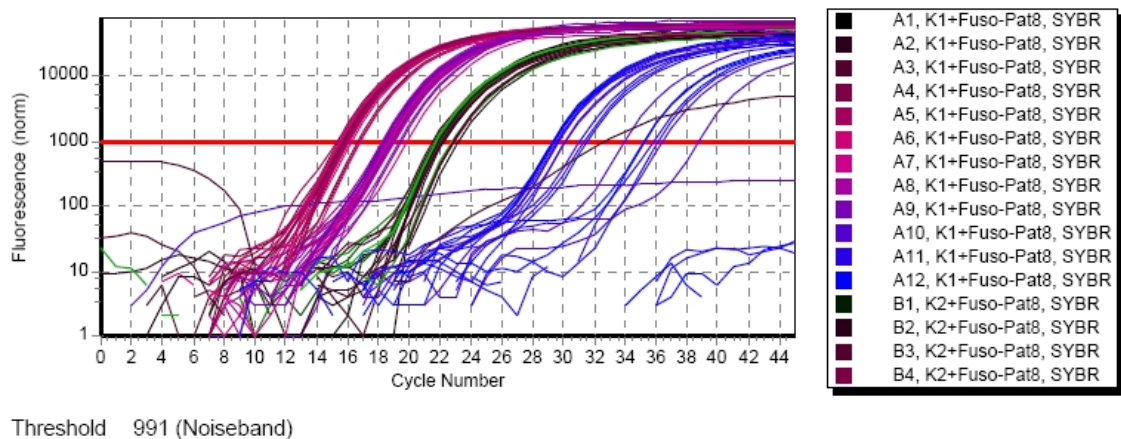


Abb. 20. Verlauf der RT-PCR mit Darstellung des Fluoreszenzschwellenwertes.

Aus diesen  $C_T$ -Werten erfolgte die Bestimmung der Genexpression mittels der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (Livak and Schmittgen, 2001; Schmittgen and Livak, 2008).

Im ersten Schritt wurde für jede Probe der  $C_T$ -Wert des Referenzgens vom  $C_T$ -Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert und der  $\Delta C_T$ -Wert errechnet (Livak and Schmittgen, 2001; Schmittgen and Livak, 2008):

$$\Delta C_T = C_T (\text{Zielgen}) - C_T (\text{Referenzgen})$$

Nach der Bestimmung des  $\Delta C_T$ -Werts innerhalb der einzelnen Testgruppen sollten im Folgenden die  $C_T$ -Werte der behandelten Gruppen mit denen der Kontrolle verglichen werden. Hierzu wurde  $\Delta C_T$  der Kontrolle von  $\Delta C_T$  der anderen Gruppen subtrahiert und  $\Delta\Delta C_T$  berechnet (Livak and Schmittgen, 2001; Schmittgen and Livak, 2008):

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Behandlung}) - \Delta C_T (\text{Kontrolle})$$

Die Genexpression ist durch die Gleichung  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  definiert, so dass die  $\Delta\Delta C_T$ -Werte in einem letzten Schritt in diese eingesetzt wurden (Livak and Schmittgen, 2001; Schmittgen and Livak, 2008):

$$\text{Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

### 3.5.2 Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) von RANKL

Zur weiteren Quantifizierung von RANKL wurde ein ELISA-Nachweis durchgeführt. Dabei wurde der Frage nachgegangen, ob sRANKL im Überstand der Versuchsgruppen (aus Kap. 3.4), welche mit einem Druck von 2 g/cm<sup>2</sup> und einem Druck von 2 g/cm<sup>2</sup> sowie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* behandelt wurden, nachweisbar ist. Dieser Nachweis war nach Anleitung von Herstellerprotokollen (BioVendas GmbH) durchzuführen.

Von den verwendeten Versuchsgruppen wurde der Überstand abgenommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Von jeder Probe wurden jeweils 100 µl in drei neue Reaktionsgefäße pipettiert. Im ersten Reaktionsgefäß erfolgte keine Verdünnung, im zweiten erfolgte eine 20× Verdünnung der Probe mit Dilution Buffer und im dritten eine 400× Verdünnung der Probe mit Dilution Buffer. Anschließend wurde eine 96-Well-ELISA-Platte vorbereitet. In jedes Well der Platte wurden 100 µl der verschiedenen Proben pipettiert. Zur Kontrolle der Qualität waren in neun leere Wells siebenmal 100 µl der verschiedenen Master Standards (c= 32/16/8/4/2/1 pmol/l), einmal 100 µl Quality Control High und einmal 100 µl Quality Control Low zu pipettieren. Die Platte wurde bei 4°C für 16-20h auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss waren die Wells fünfmal mit 0,35 ml 1× Wash Solution zu waschen. In jedes Well wurden 100 µl des primären RANKL-Antikörpers Biotin Labelled Antibody, der zuvor 2h bei Raumtemperatur inkubiert wurde, zugegeben. Die Platte war in der Folge 1h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler zu inkubieren. Nach weiterem fünfmaligen Waschen mit 0,35 ml 1× Wash Solution erfolgte die Zugabe von 100 µl des sekundären Antikörpers Streptavi-

din-Horseradishperoxidase-Conjugate in jedes Well. Dabei war die Meerrettichperoxidase das Marker-Enzym, welches auf Grund seiner Fluoreszenz detektiert werden konnte. Nach weiterer Inkubation und fünfmaligem Waschen wurden 100 µl Substrate Solution in jedes Well pipettiert, um eine enzymatische Reaktion zu starten. Diese Reaktion bedingte eine langsame Farbumwandlung. Nach 25minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Farbentwicklung mit 100 µl Stop Solution gestoppt.

Abschließend wurde die Konzentration der Farbe innerhalb von 5 min nach Beendigung der Reaktion mittels eines Spektrophotometers bei den Wellenlängen 450 nm und 630 nm gemessen und die entstandene Kurve mit einer Standard Kurve (BioVendor GmbH) verglichen.

### **3.5.3 Proteinbestimmung mittels eines Western-Blots**

Der Nachweis von OPG und RANKL und deren weitere Quantifizierung sollten durch einen Western-Blot erfolgen. Dazu mussten die Gesamtproteine aus den behandelten PDL-Zellen isoliert werden.

#### **3.5.3.1 Isolation der Proteine aus den PDL-Zellen**

Vor der Isolation der Gesamtproteine waren die PDL-Zellen der vier Versuchsgruppen (aus Kap. 3.4) wie in Kap. 3.3.3 und 3.3.4 zu trypsinieren und mit dem Zellzähler zu ermitteln. Nach anschließender 10-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 14.000 U/min sedimentierten die Proteine und waren als kleines, weißes Pellet sichtbar. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Die Lyse des Zellpellets erfolgte mit dem CelLytic™ M Cell Lysis-Reagent nach Herstellerangaben. Diese besagten, dass pro 250.000 Zellen 125 µl des Lysepuffers zugegeben werden müssen. Deshalb wurde in jede Probe die entsprechende Menge an CelLytic™ M Cell Lysis-Reagent zupipettiert (ca. 300 µl) und der ganze Ansatz 15 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Die lysierten Zellen wurden in ein 1 ml Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 16.000 U/min. Dadurch sedimentierten die sonstigen Zellbestandteile und die Proteine verblieben im Überstand. Dieser wurde abgenommen und in ein neues 1 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Bei Zeitmangel konnten die Überstände bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren werden.

### 3.5.3.2 Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran

Die Proteine mussten zum immunologischen Nachweis und zur Detektion auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid-Membran) mittels eines Western-Blots überführt werden. Zuerst wurden hierfür ein 12%-iges SDS-Trenngel und ein Sammelgel nach Herstellerangaben vorbereitet (Tab. 10).

Tabelle 10. Zusammensetzung des 12%igen SDS-Trenngels und des Sammelgels.

Bestandteile	SDS-Trenngel (12%)	Sammelgel
H <sub>2</sub> O	1,6 ml	1,4 ml
Acrylamid Mix (30%)	2,0 ml	330 µl
Tris (1,5M; pH 8,8)	1,3 ml	250 µl
SDS (10%)	50 µl	20 µl
APS	50 µl	20 µl
TEMED	2 µl	2 µl
Bromphenolblau	-	0,6 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	5 ml	1,5 ml

Nach der Herstellung der benötigten Menge wurde das SDS-Trenngel in die Elektrophoresekammer (11cm × 14cm) eingefüllt und dessen Polymerisation abgewartet. Auf dieses Gel wurde das Sammelgel aufgetragen. In der Kammer war ein 12-fach Gelkamm eingebracht, der zwölf nebeneinander liegende Bereiche ausspartete. Während der Polymerisation wurden die Proteinproben bei 99°C 5 min lang aufgeköcht, um die Proteine zu denaturieren. In die ausgesparten Taschen wurden nach abgeschlossener Polymerisation 10 µg der oben hergestellten Proteinproben mit Zusatz von H<sub>2</sub>O (Gesamtvolumen 20 µl) und 6 µl des Ladepuffers Roati Load 1 (4×) pipettiert. Zur Pufferung wurde ein 1× SDS-Laufpuffer verwendet, dessen Herstellung nach Standardprotokollen erfolgte (Tab. 11).

Tab. 11. Bestandteile und Herstellung einer 1× SDS-Laufpufferlösung.

<b>Bestandteile</b>	<b>Menge für 10× SDS-Laufpufferlösung</b>
Tris (pH 8,5)	30 g
SDS	10 g
Glycin	144 g
in dest. H <sub>2</sub> O lösen und mit diesem auf ein Volumen von 1.000 ml auffüllen	
Für 1× SDS-Lösung: 100 ml SDS-Lösung (10×) + 900 ml dest. H <sub>2</sub> O	

Das Anlegen einer Spannung von 80 V für 20 min. an die Kammer bewirkte das Einlaufen der Proben in das Sammelgel. Durch die anschließende Erhöhung der Spannung auf 120 V für 90 min. erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine.

Die Behandlung der PVDF-Membran mit Methanol für 30 sec bewirkte deren Aktivierung. Das SDS-Gel wurde auf die PVDF-Membran gelegt und beide wiederum zwischen mehrere Lagen mit 10× Blotpuffer-Lösung (Herstellung s. Tab. 12) durchtränktem Filterpapier eingelegt.

Tab. 12. Bestandteile und Herstellung einer 10× Blotpuffer-Lösung.

<b>Bestandteile</b>	<b>Menge für 10× Blotpuffer-Lösung</b>
Tris	5,8 g
Glycin	2,9 g
Methanol	200 ml
SDS (10%)	3,7 ml
in dest. H <sub>2</sub> O lösen mit diesem auf ein Volumen von 1.000 ml auffüllen	

Der o.g. Stapel wurde mit zwei Flächenelektroden aus Graphit in direkten Kontakt gebracht (Abb. 21). Die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte mittels eines Semi-Dry-Blotters bei einer Stromstärke von 80 mA für 60 min.

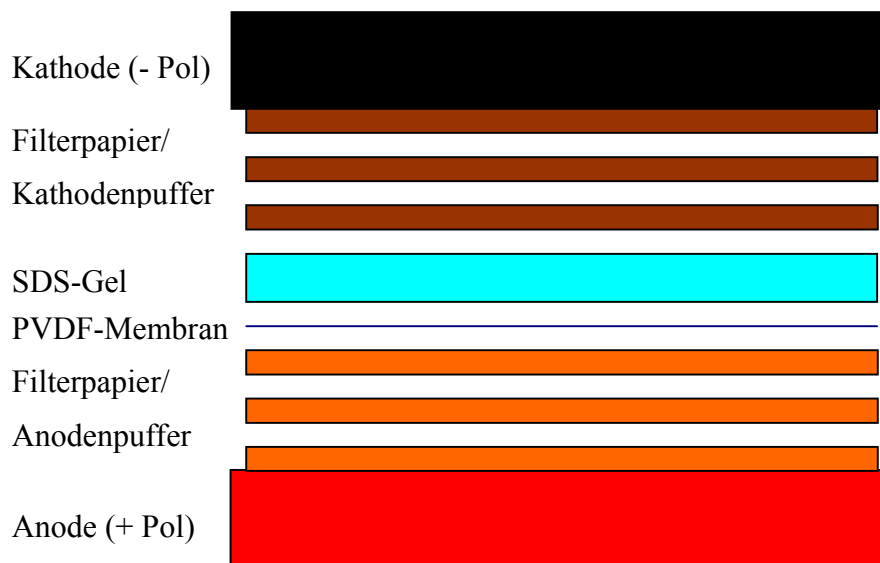


Abb. 21. Schematische prinzipielle Darstellung eines Western-Blot Proteintransfers.

### 3.5.3.3 Immunologische Färbung der Proteine OPG und RANKL

Nachdem die Proteine auf die PVDF-Membran transferiert wurden, sollte als erstes die immunologische Färbung von RANKL stattfinden. Vor der Zugabe der Antikörper erfolgte die Behandlung der Membran mit einer Blockierlösung. Dabei handelte es sich um eine Proteinlösung, für die 5% Milch mit 95% 1× TBS-T (Herstellung s. Tab. 13) gemischt wurden. Diese Lösung sollte unspezifische Bindungsstellen vor der Zugabe des Antikörpers belegen, um fehlerhafte Ergebnisse zu vermeiden. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler im Kühlschrank inkubiert.

Tab. 13. Bestandteile und Herstellung einer 1× TBS-T Lösung.

Bestandteile	Menge für 10× TBS-T Lösung
Tris Base	24,23 g
NaCl	80,06 g
dest. H <sub>2</sub> O	800 ml
mit konz. HCl pH 7,5 einstellen (ca. 150 ml)	
mit dest. H <sub>2</sub> O auf ein Volumen von 1.000 ml auffüllen	
Für 1× TBS-T Lösung: 100 ml TBS-T (10×) + 899 ml dest. H <sub>2</sub> O + 1 ml Tween20	

Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe des primären Antikörpers (Rabbit Polyclonal Anti-RANKL Antikörper, Verdünnung 1:2.000) in einer Lösung mit 0,5% Milch und 99,5% TBS-T mit anschließender Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Die Membran wurde dreimal mit TBS-T für jeweils 10 min bei Raumtemperatur gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers (Anti-Rabbit IgG-Meerrettichperoxidase, Verdünnung 1:10.000) – gelöst in 0,5% Milch und 99,5% TBS-T - zur PVDF-Membran. Der sekundäre Antikörper band an den primären Antikörper. Die Meerrettichperoxidase war dabei das Marker-Enzym, welches an den zweiten Antikörper gebunden war und später detektiert werden konnte. Nach der Inkubation (60 min bei Raumtemperatur) war die Membran zweimal für jeweils 10 min mit TBS-T, einmal mit PBS für 5 min und nochmals mit TBS-T für 5 min zu waschen. Die Chemilumineszenzdetektion des Geldokumentationssystems „Genoplex“ bewirkte das farbliche Erscheinen der immunpositiven Banden (Abb. 22).

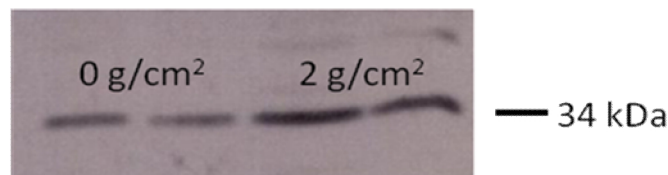


Abb. 22. Nachweis von RANKL im Gesamtprotein mittels eines Western-Blots bei den verschiedenen Versuchsgruppen (Abbildung: Dr. P. Römer, Poliklinik für Kieferorthopädie, Universitätsklinikum Regensburg).

Im Anschluss an den RANKL-Nachweis musste die PVDF-Membran mittels Stripping für den Nachweis von OPG vorbereitet werden. Die Membran wurde als erstes zweimal mit PBS jeweils 10 min gewaschen. Es erfolgte die Behandlung der Membran nach Herstellerangaben mit 1 ml des Stripping-Puffers Re-Blot Plus Mild (10×) und 9 ml destilliertem H<sub>2</sub>O. Nach der Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur wurde die PVDF-Membran dreimal für jeweils 10 min mit PBS gewaschen. Das Stripping bewirkte das Abwaschen der vorher verwendeten Antikörper ohne die aufgetrennten Gesamtproteine zu beeinflussen.

Nach diesem Vorgang konnte der immunologische Nachweis von OPG erfolgen. Das Vorgehen war analog zum Nachweis von RANKL. Es wurde ein primärer Antikörper (Rabbit Polyclonal Anti-OPG Antikörper, Verdünnung 1:1.200) – gelöst in 5% Milch

und 95% TBS-T - zur Bindung an die OPG-Proteine verwendet. Der komplementäre sekundäre Antikörper (Anti-Rabbit IgG-Meerrettichperoxidase, Verdünnung 1:10.000) war wie vorher Träger des Marker-Enzyms Meerrettichperoxidase. Die Detektion erfolgte ebenfalls mit der Chemilumineszenzdetektion des Geldokumentationssystems. Über das zugehörige PC Programm „GenoSoft“ der Firma VWR International konnten die Daten über das Verhältnis von OPG und RANKL ausgewertet werden.

### **3.5.4 Osteoklastendifferenzierungsassay**

#### **3.5.4.1 Co-Kulturen von PDL-Zellen und RAW 264.7-Zellen**

In diesem Experiment sollte wegen der vermuteten Veränderungen im RANKL/OPG-Verhältnis die Differenzierung der Osteoklasten in den jeweiligen Versuchsgruppen überprüft werden. Um diese Vorgänge genauer zu untersuchen, wurden die murinen Zellen RAW 264.7 (Murine leukaemic monocyte macrophage cell line) verwendet. Bei diesen Zellen handelt es sich um runde Vorläuferzellen der Osteoklasten (Collin-Osdoby et al., 2003; Lossdörfer und Mitarb., 2011). Diese sind optimal für die Untersuchung der Osteoklastogenese und der Funktion der Osteoklasten geeignet (Collin-Osdoby et al., 2003; Lossdörfer und Mitarb., 2011), weil sie auf das Vorhandensein von menschlichen Faktoren (z.B. OPG und RANKL) reagieren (Lossdörfer und Mitarb., 2011). Deshalb sollten Co-Kulturen von PDL-Zellen und RAW 264.7-Zellen angelegt werden. Dafür wurden die vier bestehenden Versuchsgruppen aus Kap. 3.4 verwendet. Aufgrund guter Ergebnisse aus den Vorversuchen wurden bei den mit Bakterien behandelten Gruppen nur diejenigen ausgewählt, die mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* versetzt waren.

Aus jedem Well der vier Versuchsgruppen wurde im Anschluss an die Behandlung mit Druck und Bakterien das Vollmedium abgenommen und die Zellen mit 1 ml PBS sorgfältig gewaschen. In der Folge waren in jedes Well 60.000 RAW 264.7-Zellen auszusäen und 2 ml Vollmedium zu pipettieren. Die Co-Kulturen wurden drei Tage bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert.



### 3.5.4.2 TRAP-Färbung der Co-Kulturen

Zum Nachweis der differenzierten osteoklastenähnlichen Zellen sollten die Co-Kulturen nach Ablauf der drei Tage mittels einer TRAP-Färbung (Tartrate Resistant Acid Phosphatase) gefärbt werden. Diese war nach Anleitung von Standardprotokollen durchzuführen.

Zuerst wurden 10 mg Naphtol Phosphate Disodium Salt in 1 ml destilliertem H<sub>2</sub>O gelöst. Aus 35,2 ml Natriumacetatlösung (0,2 M), 10 ml Essigsäurelösung (0,2 M) und 50 ml H<sub>2</sub>O wurde ein Acetatpuffer (0,1 M) vorbereitet. Danach erfolgte die Herstellung des TRAP-Puffers mit einem Gesamtvolumen von 50 ml aus folgenden Bestandteilen:

- 25 ml Acetat Puffer (0,1 M)
- 5 ml Natriumtartrat (0,3 M)
- 0,5 ml Naphtol AS-MX phosphate (10mg/ml; Herstellung s.o.)
- 50 µl Triton® X-100
- 19,45 ml Milli-Q-Wasser

In einem letzten Schritt war die TRAP-Färbung herzustellen. Dafür wurde der TRAP-Puffer bei 37°C im Wasserbad vorgewärmt und in jedem Milliliter des TRAP-Puffers 0,3 mg Fast Red Violet LB Stain gelöst.

Zur Vorbereitung der Färbung waren in einem ersten Schritt die Zellen nach Absaugen des Nährmediums mit auf 37°C vorgewärmtem PBS zu waschen. Die anschließende Zugabe von 1 ml Glutaraldehyd (10%) und Inkubation für 15 min bei 37°C bewirkte die Fixierung der Zellen. Nach weiterem zweimaligen Waschen der Zellen mit 37°C warmem PBS wurden in jedes Well 700 µl der TRAP-Färbung zupipettiert. Die folgende Inkubation erfolgte für ca. 10 min bei 37°C. In einem letzten Schritt erfolgten die Abnahme der Färbelösung und das Waschen der Zellen mit PBS.

Die Zellen konnten nun unter dem Lichtmikroskop bei 100-facher und 200-facher Vergrößerung auf ihren Gehalt an TRAP-positiven Zellen untersucht werden. Diese Zellen wurden durch die Lösung rot/violett angefärbt (Abb. 23). Für den Vergleich der verschiedenen Versuchsgruppen untereinander wurde zuerst bei zufällig ausgewählte Gesichtsfeldern am Lichtmikroskop (Vergrößerung: ×200) die Anzahl an osteoklastenähn-

lichen Zellen ausgezählt. Im Anschluss wurde die Gesamtanzahl an diesen Zellen in jedem einzelnen Well bestimmt und statistisch ausgewertet.

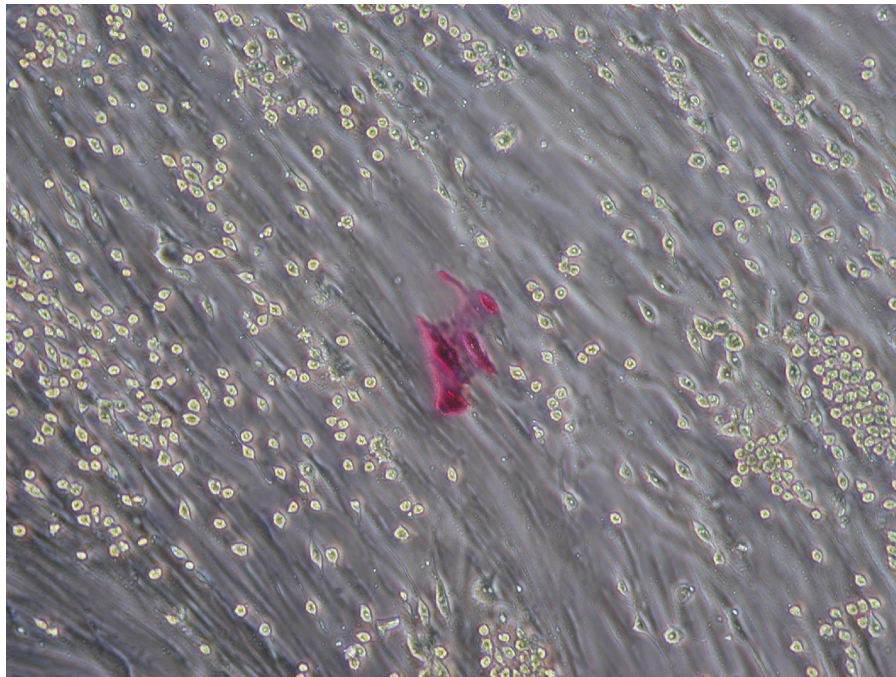


Abb. 23. Angefärbte osteoklastenähnliche Zellen in der Co-Kultur von PDL-Zellen (spindelförmig) und RAW 264.7-Zellen (rund) (TRAP,  $\times 200$ ).

### 3.5.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SigmaPlot® v. 8.0 für Windows® (Firma SPSS Inc.). Die Resultate aller Versuche wurden als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen angegeben. Zum Test der Signifikanz der Ergebnisse wurde der SPSS Einweg-Anova Test verwendet, um die Mittelwerte und Standardabweichungen der Ergebnisse auf ihre statistische Signifikanz zu untersuchen. Der Osteoklastendifferenzierungsassay wurde zusätzlich noch dem Dunnett's T3 Post-hoc-Test unterzogen, um die statistische Signifikanz aller Versuchsgruppen in Bezug auf eine Referenzgruppe (z.B. unbehandelte Versuchsgruppe) auszuwerten. Beide Tests basierten auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$ . Bei  $p \leq 0,05$  (\*) wurde eine statistische Signifikanz und bei  $p \leq 0,01$  (\*\*) eine hohe statistische Signifikanz erreicht.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Isolation und Charakterisierung der PDL-Zellen

In den täglichen lichtmikroskopischen Kontrollen wurde stetig das Auswachsen der PDL-Zellen aus den Zellfragmenten kontrolliert. Dabei zeigte sich die ungestörte kontinuierliche Vermehrung der Zellen (Abb. 24), die anhand ihrer spindelförmigen Morphologie eindeutig als PDL-Zellen verifiziert wurden. Zudem war eine Kontaminierung durch Hefepilze oder sonstige Mikroorganismen nicht festzustellen.

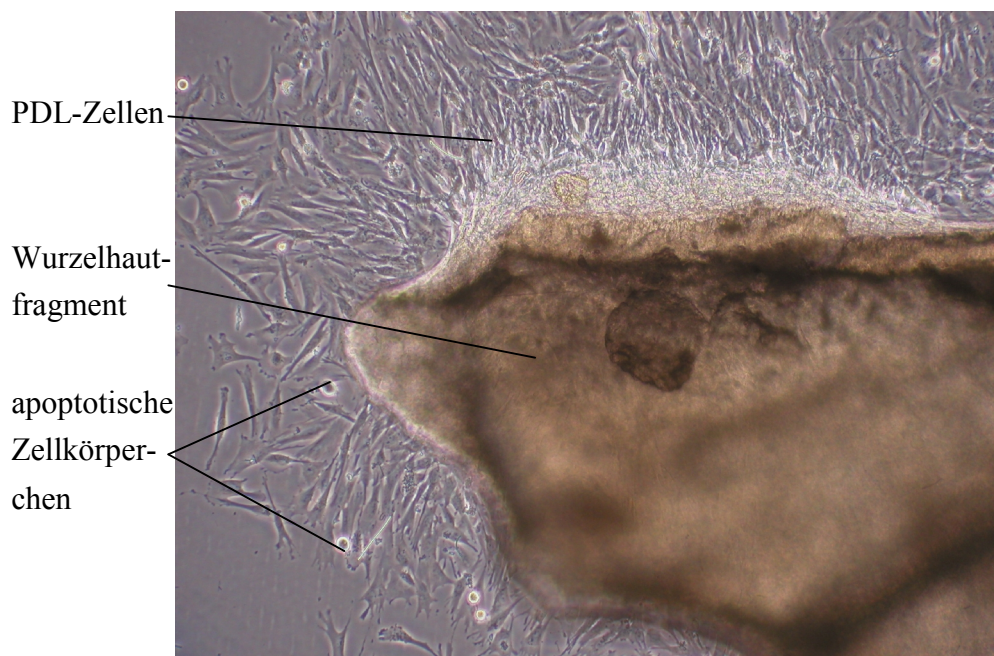


Abb. 24. Proliferierende PDL-Zellen (spindelförmig) aus einem isolierten Wurzelhautfragment (braun) mit einzelnen apoptotischen Zellkörperchen (rund) ( $\times 200$ ).

Die weitere Identifikation erfolgte durch die Messung der Genexpression mittels einer PCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese. Untersucht wurden die Gene Alkalische Phosphatase (ALP), Bone Sialoprotein (BSP), Fibromodulin, Osteoprotegerin (OPG), Periostin, RANKL und RUNX2 (Abb. 25). Die Amplifikate entsprachen den jeweiligen vorhergesagten Fragmentgrößen, wie sie in Tabelle 14 angegeben sind.



Abb. 25. Bandenmuster einer Agarose-Gelelektrophorese zur Identifikation von PDL-Zellen mit Standardkontrolle links in 100 bp Schritten.

Tab. 14. Basenpaarlängen der diversen untersuchten Gene.

Gen	Basenpaarlänge
Alkalische Phosphatase (ALP)	200 bp
Bone Sialoprotein (BSP)	260 bp
Fibromodulin (FMOD)	190 bp
Osteoprotegerin (OPG)	150 bp
Periostin (POSTN)	240 bp
RANKL	250 bp
RUNX2	205 bp

Das vorliegende Expressionsmuster bestätigte nach der morphologischen Verifizierung das Vorhandensein einer PDL-Zellkultur. Es zeigte sich wiederum die Fähigkeit dieser Zellen, fibroblastische Gene wie Fibromodulin und Alkalische Phosphatase etc. zu exprimieren und dadurch am Stoffwechsel des Bindegewebes beteiligt zu sein. Die Transkription von osteoblastischen Genen, wie Alkalische Phosphatase, Bone Sialoprotein, Osteoprotegerin, RANKL und RUNX2 sind ein weiteres Charakteristikum der PDL-Zellen. Deren Expression bestätigt die Fähigkeit der PDL-Zellen, neben dem Bindegewebs- auch den Knochenstoffwechsel und somit das Remodelling zu beeinflussen.

Auch im weiteren Verlauf der Anzüchtung und Passagierung der PDL-Zellen ergab sich unter den gewählten Umgebungsbedingungen ein rasches Wachstum der PDL-Zellen ohne Kontaminierung durch diverse Mikroorganismen.

## 4.2 Stimulation mit *Fusobacterium nucleatum* und Kraftapplikation

### 4.2.1 Genexpression von OPG

Die Auswertung der Real-Time PCR zeigte eine leichte Erhöhung der Genexpression von Osteoprotegerin bei den behandelten Versuchsgruppen im Vergleich zur unbehandelten Gruppe (Abb. 26). Dabei wurde die höchste Genexpression in der Versuchsgruppe, welche mit Druck (2 g/cm<sup>2</sup>) und *Fusobacterium nucleatum* behandelt wurde, gefunden. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der normalisierten Genexpression waren statistisch signifikant ( $p = 0,023$ ).

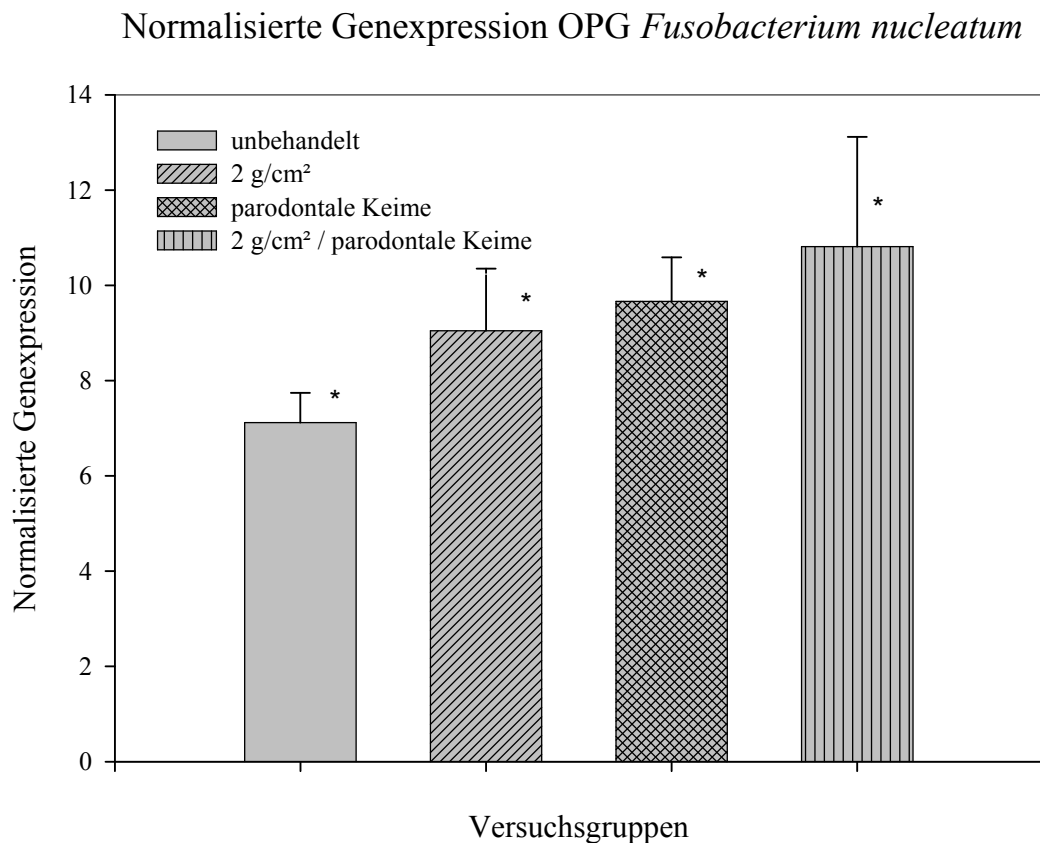


Abb. 26. Normalisierte Genexpression von OPG bei den verschiedenen Versuchsgruppen. Ergebnisangabe der einzelnen Gruppen: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Unbehandelt: 7,118  $\pm$  0,625. 2 g/cm<sup>2</sup>: 9,047  $\pm$  1,302. Parodontale Keime: 9,665  $\pm$  0,923. 2 g/cm<sup>2</sup> und parodontale Keime: 10,813  $\pm$  2,306. Nach dem Anova-Test sind p-Werte  $\leq 0,05$  statistisch signifikant (\*).

In Tabelle 15 wird dargelegt, um welchen Faktor die Genexpression von OPG der behandelten Gruppen im Vergleich zur unbehandelten Gruppe hochreguliert wurde.

Tab. 15. Vergleich der Genexpression von OPG.

Versuchsgruppe	Veränderungsfaktor der Genexpression im Vergleich zu unbehandelter Gruppe
Druck (2 g/cm <sup>2</sup> ), ohne pathogene Keime	1,28
ohne Druck, mit pathogenen Keimen	1,37
mit Druck (2 g/cm <sup>2</sup> ), mit pathogenen Keimen	1,53

#### 4.2.2 Genexpression von RANKL

Die Genexpression von RANKL war - wie die von OPG - ebenfalls erhöht (Abb. 27). Der Vergleich zur unbehandelten Gruppe zeigte bei allen behandelten Versuchsgruppen eine hochregulierte Expression von RANKL. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der normalisierten Genexpression waren auch statistisch signifikant ( $p = 0,011$ ).

Normalisierte Genexpression RANKL *Fusobacterium nucleatum*

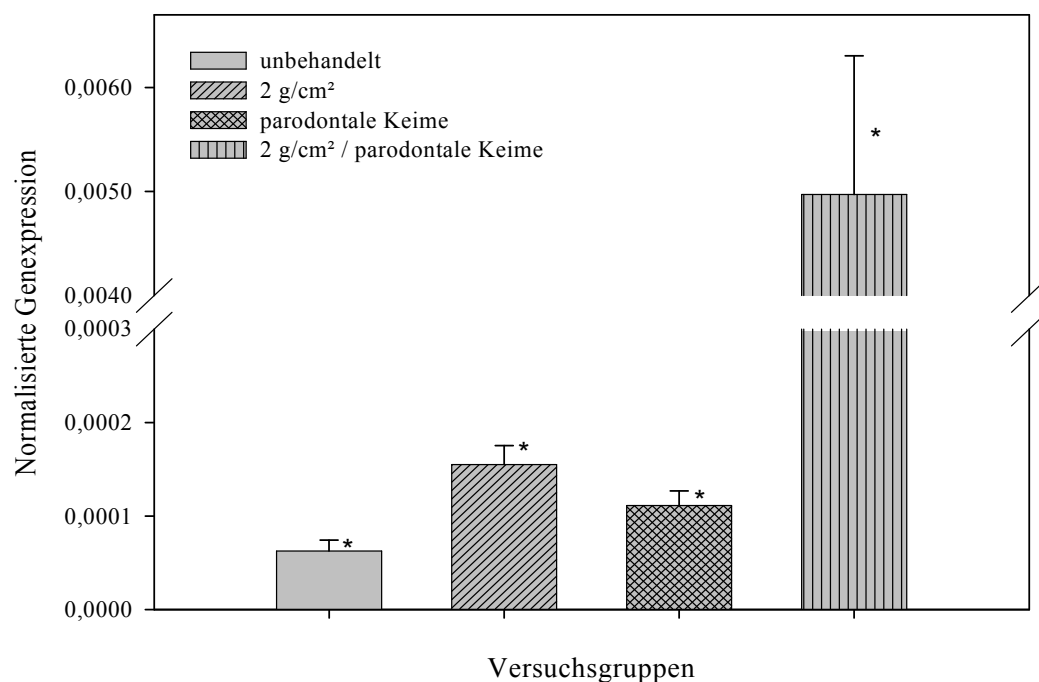


Abb. 27. Normalisierte Genexpression von RANKL bei den verschiedenen Versuchsgruppen. Ergebnisangabe der einzelnen Gruppen: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Unbehandelt:  $6,261 \times 10^{-5} \pm 1,162 \times 10^{-5}$ . 2 g/cm<sup>2</sup>:  $1,550 \times 10^{-4} \pm 0,201 \times 10^{-4}$ . Parodontale Keime:  $1,112 \times 10^{-4} \pm 0,156 \times 10^{-4}$ . 2 g/cm<sup>2</sup> und parodontale Keime:  $4,972 \times 10^{-3} \pm 1,333 \times 10^{-3}$ . Nach dem Anova-Test sind p-Werte  $\leq 0,05$  statistisch signifikant (\*).

Dabei ergab sich bei der Versuchsgruppe, welche mit Kraftapplikation (2 g/cm<sup>2</sup>) behandelt wurde, ein 1,4mal höherer Expressionswert als bei der mit *Fusobacterium nucleatum* behandelten Gruppe. Die mit der Kombination aus Druck und *Fusobacterium nucleatum* behandelte Versuchsgruppe wies eine deutliche Hochregulation von RANKL auf, die sich um das 30- bis 80-fache von den restlichen Versuchsgruppen unterschied.

Die genauen Werte der Hochregulation von RANKL in Bezug auf die unbehandelte Versuchsgruppe sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tab. 16. Vergleich der Genexpression von RANKL.

Versuchsgruppe	Veränderungsfaktor der Genexpression im Vergleich zu unbehandelter Gruppe
Druck (2 g/cm <sup>2</sup> ), ohne pathogene Keime	2,47
ohne Druck, mit pathogenen Keimen	2,06
mit Druck (2 g/cm <sup>2</sup> ), mit pathogenen Keimen	79,40

#### 4.2.3 RANKL/OPG-Verhältnis

Das Verhältnis der Konzentration von RANKL zu OPG zeigte sich bei den behandelten Versuchsgruppen in Bezug auf die unbehandelte Gruppe deutlich bis sehr stark erhöht (Abb. 28 und Tab. 17). Obwohl OPG und RANKL hochreguliert wurden, ergab sich eine vielmal stärkere Expression von RANKL als von OPG. Unter den behandelten Versuchsgruppen waren eindeutige Unterschiede zu erkennen. Die reine Behandlung mit Kraftapplikation (2 g/cm<sup>2</sup>) zeigte ein 1,5mal höheres RANKL/OPG-Verhältnis als die nur mit *Fusobacterium nucleatum* behandelte Gruppe. Das größte Verhältnis wies die mit Druck (2 g/cm<sup>2</sup>) und *Fusobacterium nucleatum* behandelte Versuchsgruppe auf, welches um das 25- bis 50-fache im Vergleich zu den restlichen Gruppen erhöht war. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der normalisierten Genexpression beim Verhältnis von RANKL zu OPG waren sogar statistisch hochsignifikant (p = 0,001).

### Verhältnis RANKL/OPG *Fusobacterium nucleatum*

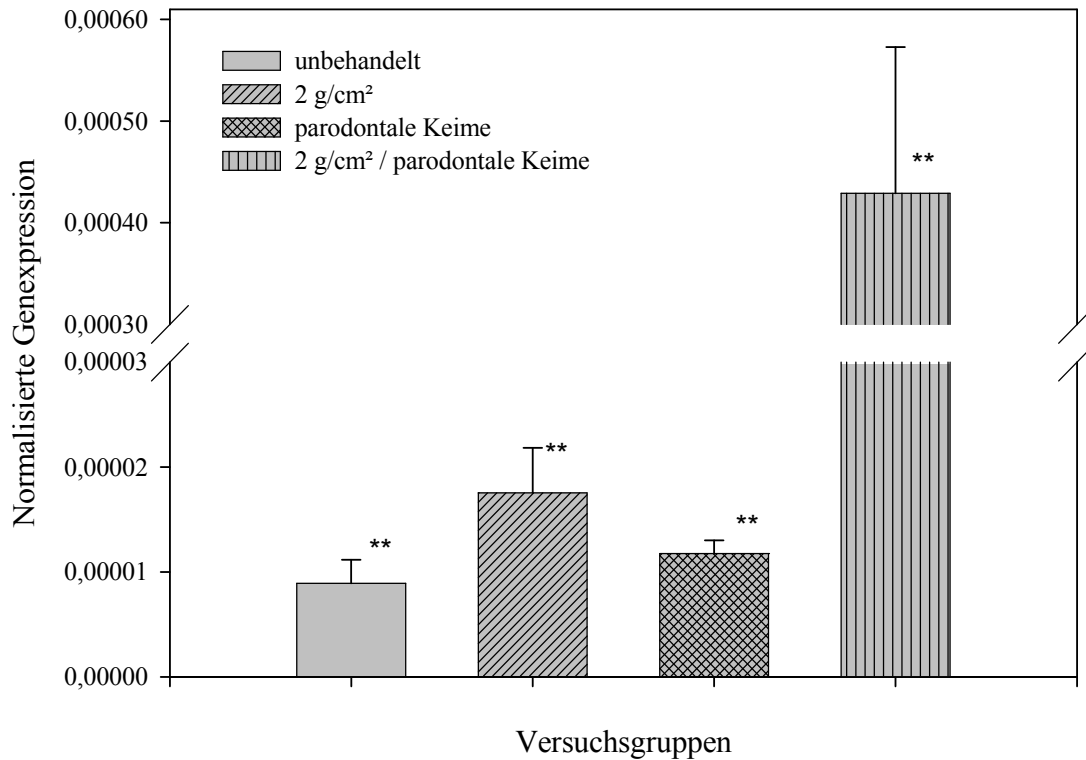


Abb. 28. Verhältnis von RANKL zu OPG bei den verschiedenen Versuchsgruppen. Ergebnisangabe der einzelnen Gruppen: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Unbehandelt:  $8,908 \times 10^{-6} \pm 2,255 \times 10^{-6}$ . 2 g/cm<sup>2</sup>:  $1,754 \times 10^{-5} \pm 4,287 \times 10^{-6}$ . Parodontale Keime:  $1,174 \times 10^{-5} \pm 1,269 \times 10^{-6}$ . 2 g/cm<sup>2</sup> und parodontale Keime:  $4,289 \times 10^{-4} \pm 1,437 \times 10^{-4}$ . Nach dem Anova-Test sind p-Werte  $\leq 0,01$  statistisch hochsignifikant (\*\*).

Tab. 17. Vergleich des RANKL/OPG-Verhältnisses.

Versuchsgruppe	Veränderungsfaktor der Genexpression im Vergleich zu unbehandelter Gruppe
Druck (2 g/cm <sup>2</sup> ), ohne pathogene Keime	1,97
ohne Druck, mit pathogenen Keimen	1,32
mit Druck (2 g/cm <sup>2</sup> ), mit pathogenen Keimen	48,15



### 4.3 Stimulation mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und Kraftapplikation

#### 4.3.1 Genexpression von OPG

Auch in diesem Versuch zeigte sich die gleiche Tendenz wie in Kap. 4.2. Bei den behandelten Gruppen war die Genexpression von OPG im Vergleich zur unbehandelten Gruppe deutlich hochreguliert (Abb. 29). Allerdings war die Expression um das 1,2- bis 1,8-fache höher als in o.g. Kapitel. Die Genexpression war bei der mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* behandelten Gruppe 1,25mal stärker als bei der nur mit Druck behandelten Gruppe. Die mit klarem Abstand höchste Genexpression wurde in der Versuchsgruppe, welche mit Druck (2 g/cm<sup>2</sup>) und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* behandelt wurde, gefunden. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Genexpression waren bei allen Versuchsgruppen statistisch hochsignifikant ( $p < 0,001$ ).

Normalisierte Genexpression OPG *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

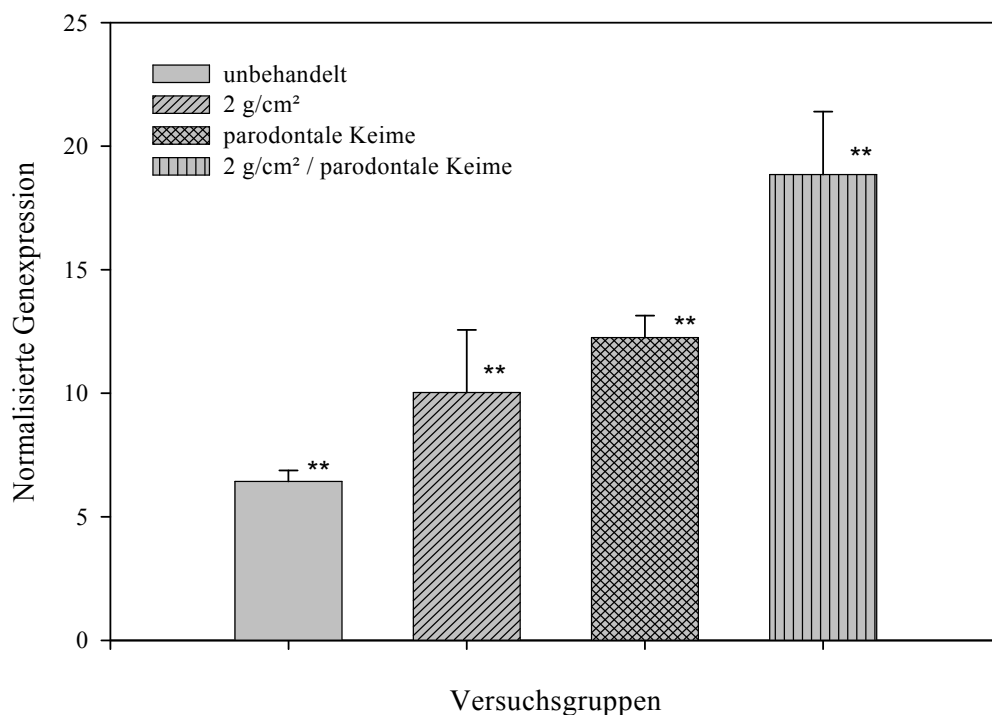


Abb. 29. Normalisierte Genexpression von OPG bei den verschiedenen Versuchsgruppen. Ergebnisangabe der einzelnen Gruppen: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Unbehandelt:  $6,431 \pm 0,445$ . 2 g/cm<sup>2</sup>:  $10,029 \pm 2,535$ . Parodontale Keime:  $12,255 \pm 0,888$ . 2 g/cm<sup>2</sup> und parodontale Keime:  $18,852 \pm 2,545$ . Nach dem Anova-Test sind p-Werte  $\leq 0,01$  statistisch hochsignifikant (\*\*).

Neben der Expression waren auch die Veränderungsfaktoren, um die die Genexpressionen von OPG der jeweiligen behandelten Gruppen im Vergleich zur unbehandelten Gruppe hochreguliert wurden, größer als im o.g. Kapitel (Tab. 18).

Tab. 18. Vergleich der Genexpression von OPG.

Versuchsgruppe	Veränderungsfaktor der Genexpression im Vergleich zu unbehandelter Gruppe
Druck (2 g/cm <sup>2</sup> ), ohne pathogene Keime	1,56
ohne Druck, mit pathogenen Keimen	1,91
mit Druck (2 g/cm <sup>2</sup> ), mit pathogenen Keimen	2,93

#### 4.3.2 Genexpression von RANKL

Die Genexpression von RANKL war bei allen behandelten Versuchsgruppen ebenfalls leicht bis deutlich hochreguliert (Abb. 30 und Tab. 19). Dabei wies - wie schon im Kapitel 4.2.2 beschrieben - die Versuchsgruppe, welche mit Druck (2 g/cm<sup>2</sup>) behandelt wurde, 3,2mal höhere Expressionswerte auf als die mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* behandelte Gruppe. Die mit Druck und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* behandelte Versuchsgruppe zeigte eine klare Hochregulation von RANKL, welche 20- bis 65mal stärker ausfiel als bei den zwei anderen behandelten Gruppen. Die statistische Auswertung der Mittelwerte und Standardabweichungen der normalisierten Genexpression ergab bei allen Versuchsgruppen eine hohe Signifikanz ( $p < 0,001$ ).

Tab. 19. Vergleich der Genexpression von RANKL.

Versuchsgruppe	Veränderungsfaktor der Genexpression im Vergleich zu unbehandelter Gruppe
Druck (2 g/cm <sup>2</sup> ), ohne pathogene Keime	8,73
ohne Druck, mit pathogenen Keimen	2,74
mit Druck (2 g/cm <sup>2</sup> ), mit pathogenen Keimen	175,05

Wie aus Tabelle 19 hervorgeht waren die Multiplikationsfaktoren der Genexpression bezogen auf die unbehandelte Gruppe wieder deutlich stärker als die aus Kap. 4.2.2.

### Normalisierte Genexpression RANKL *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

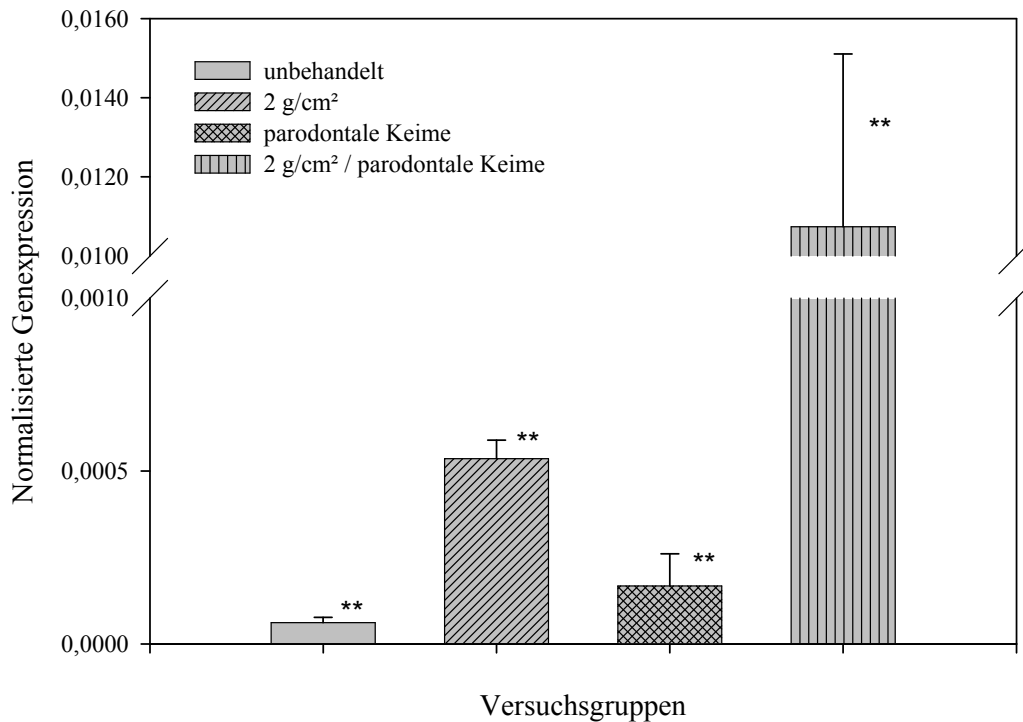


Abb. 30. Normalisierte Genexpression von RANKL bei den verschiedenen Versuchsgruppen. Ergebnisangabe der einzelnen Gruppen: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Unbehandelt:  $6,134 \times 10^{-5} \pm 1,563 \times 10^{-5}$ . 2 g/cm<sup>2</sup>:  $5,354 \times 10^{-4} \pm 5,381 \times 10^{-5}$ . Parodontale Keime:  $1,676 \times 10^{-4} \pm 9,300 \times 10^{-5}$ . 2 g/cm<sup>2</sup> und parodontale Keime:  $1,074 \times 10^{-2} \pm 4,367 \times 10^{-3}$ . Nach dem Anova-Test sind p-Werte  $\leq 0,01$  statistisch hochsignifikant (\*\*).

#### 4.3.3 RANKL/OPG-Verhältnis

Auch im Verhältnis von RANKL zu OPG spiegeln sich die gleichen Tendenzen wieder. Beide Gene waren bei den behandelten Versuchsgruppen in Bezug auf die unbehandelte Gruppe deutlich bis sehr stark hochreguliert (Abb. 31 und Tab. 20). Es zeigten sich wieder eine stärkere Expression von RANKL als von OPG sowie gravierende Unterschiede beim Vergleich der einzelnen behandelten Versuchsgruppen miteinander. So ergab sich bei der reinen Behandlung mit Druck ein 4,1mal höheres RANKL/OPG-Verhältnis als bei Behandlung mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Das größte Verhältnis wurde wiederum bei der mit Druck (2 g/cm<sup>2</sup>) und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* behandelten Versuchsgruppe nachgewiesen. Dieses Verhältnis war um das 10-fache in Bezug auf die mit Keimen behandelte Gruppe, im Vergleich zu den beiden restlichen Gruppen sogar um das 40- bis 58-fache hochreguliert. Die Mittelwerte

und Standardabweichungen der normalisierten Genexpression beim RANKL/OPG Verhältnis waren bei allen Versuchsgruppen statistisch hochsignifikant ( $p < 0,001$ ).

#### RANKL/OPG Verhältnis *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

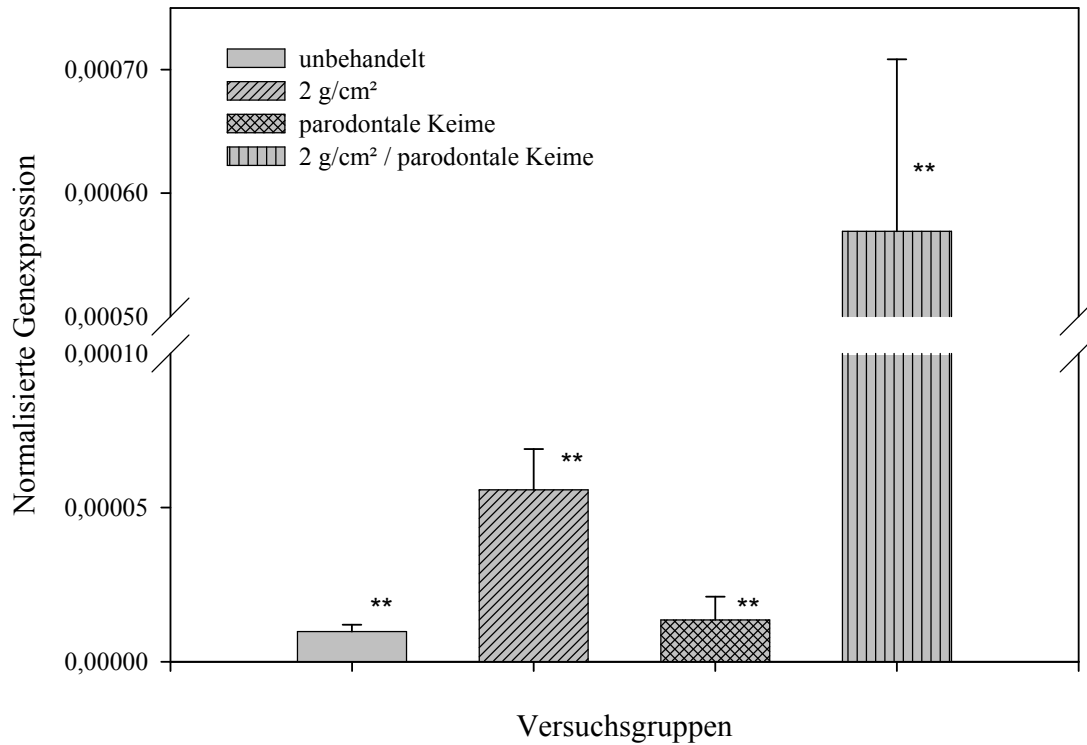


Abb. 31. Verhältnis von RANKL zu OPG bei den verschiedenen Versuchsgruppen. Ergebnisangabe der einzelnen Gruppen: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Unbehandelt:  $9,785 \times 10^{-6} \pm 2,224 \times 10^{-6}$ . 2 g/cm<sup>2</sup>:  $5,574 \times 10^{-5} \pm 1,319 \times 10^{-5}$ . Parodontale Keime:  $1,355 \times 10^{-5} \pm 7,518 \times 10^{-6}$ . 2 g/cm<sup>2</sup> und parodontale Keime:  $5,689 \times 10^{-4} \pm 1,393 \times 10^{-4}$ . Nach dem Anova-Test sind p-Werte  $\leq 0,01$  statistisch hochsignifikant (\*\*).

Tab. 20. Vergleich des RANKL/OPG-Verhältnisses.

Versuchsgruppe	Veränderungsfaktor der Genexpression im Vergleich zu unbehandelter Gruppe
Druck (2 g/cm <sup>2</sup> ), ohne pathogene Keime	5,70
ohne Druck, mit pathogenen Keimen	1,39
mit Druck (2 g/cm <sup>2</sup> ), mit pathogenen Keimen	58,14

#### 4.4 Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mittels des ELISA-Nachweises sollte das lösliche RANKL (sRANKL) im Überstand nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Auswertung zeigte, dass sich alle gemessenen Werte von RANKL im Überstand unterhalb der zur Referenz herangezogenen Standardkurve befanden.

#### 4.5 Western-Blot Quantifizierung

Bei diesem Experiment wurde das Gesamtprotein aus den PDL-Zellen isoliert. Danach sollten OPG und RANKL mittels eines Western-Blots nachgewiesen werden. Die Auswertung des Versuchs ergab den Nachweis von OPG und RANKL in allen untersuchten Proben. Da es sich hierbei um eine halbquantitative Methode handelte, waren die genauen Mengen an OPG und RANKL nur ungefähr bestimmbar. OPG wurde in den Proben mit einem Molekulargewicht von 46 kDa detektiert. Auf Grund einer höheren Konzentration an OPG im Gesamtprotein zeigte sich bei den behandelten Gruppen eine stärkere Intensität der Banden als bei der unbehandelten Gruppe. Die mit einem Druck ( $2 \text{ g/cm}^2$ ) behandelte Versuchsgruppe wies eine deutlich dunklere Bande auf als die mit parodontal-pathogenen Keimen behandelte Gruppe. Die intensivste Färbung - und damit höchste Konzentration an OPG - verzeichnete die mit Druck und Keimen behandelte Versuchsgruppe.

Die Ergebnisse für die Konzentration an RANKL im Gesamtprotein fielen simultan zu OPG aus. RANKL wurde mit einem Molekulargewicht von ca. 34 kDa in den Proben nachgewiesen. Auch hier zeigten alle behandelten Versuchsgruppen dunklere Banden als die unbehandelte Gruppe (Abb. 32). Die Abstufung der Färbung bei den behandelten Gruppen war analog zu OPG, d.h. die höchste Konzentration von RANKL war in der mit Druck und parodontal-pathogenen Keimen behandelten Versuchsgruppe zu finden.

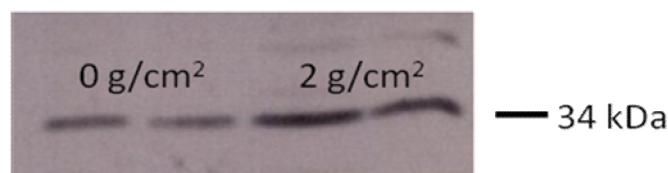


Abb. 32. Nachweis von RANKL in PDL-Zellen.

#### 4.6 Osteoklastendifferenzierungsassay mit TRAP-Färbung der Co-Kulturen

Das Co-Kultur Experiment von RAW 264.7 Zellen und PDL-Zellen diente zum indirekten Nachweis von RANKL. Dabei ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (Abb. 33). Die genauen Werte zur Anzahl der osteoklastenähnlichen Zellen gehen aus Tabelle 21 hervor.

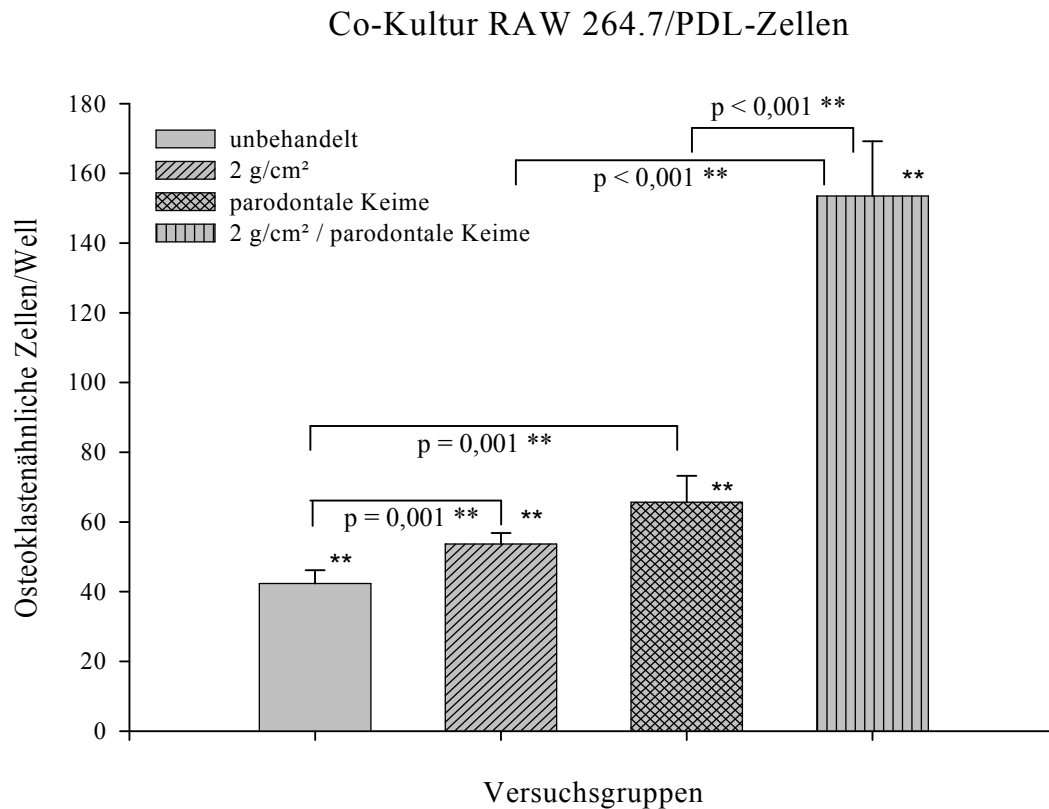


Abb. 33. Anzahl der osteoklastenähnlichen Zellen/Well für die jew. Versuchsgruppen. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen sind nach dem Anova-Test hochsignifikant, da  $p \leq 0,01$  (\*\*) ist. Beim Vergleich der Gruppen untereinander mittels des Dunnett's T3 post-hoc-Tests sind p-Werte  $\leq 0,01$  (\*\*) ebenfalls hochsignifikant.

Tab. 21. Anzahl der osteoklastenähnlichen Zellen/Well.

Versuchsgruppe	Zellzahl $\pm$ Standardabweichung
unbehandelt	42,3 $\pm$ 3,8
Druck (2 g/cm²), ohne pathogene Keime	53,6 $\pm$ 3,1
ohne Druck, mit pathogenen Keimen	65,6 $\pm$ 7,6
mit Druck (2 g/cm²), mit pathogenen Keimen	153,5 $\pm$ 15,7

Bei allen Co-Kulturen zwischen RAW 264.7-Zellen und den behandelten PDL-Zellen war die Anzahl TRAP-positiven und osteoklastenähnlichen Zellen pro Well in Bezug auf die Co-Kultur mit den unbehandelten PDL-Zellen erhöht. Die statistische Auswertung mittels Anova-Test zeigte eine hohe Signifikanz der Mittelwerte und zugehörigen Standardabweichungen ( $p < 0,001$ ). Beim statistischen Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen untereinander konnte ebenfalls die hohe Signifikanz der Ergebnisse bestätigt werden.

Bei den verschiedenen Vergrößerungsfaktoren war die deutliche Rotfärbung der Zellen eindeutig erkennbar. Bei hoher Auflösung ( $\times 200$  und  $\times 400$ ) zeigte sich die Mehrkernigkeit der TRAP-positiven und der osteoklastenähnlichen Zellen (Abb. 34).

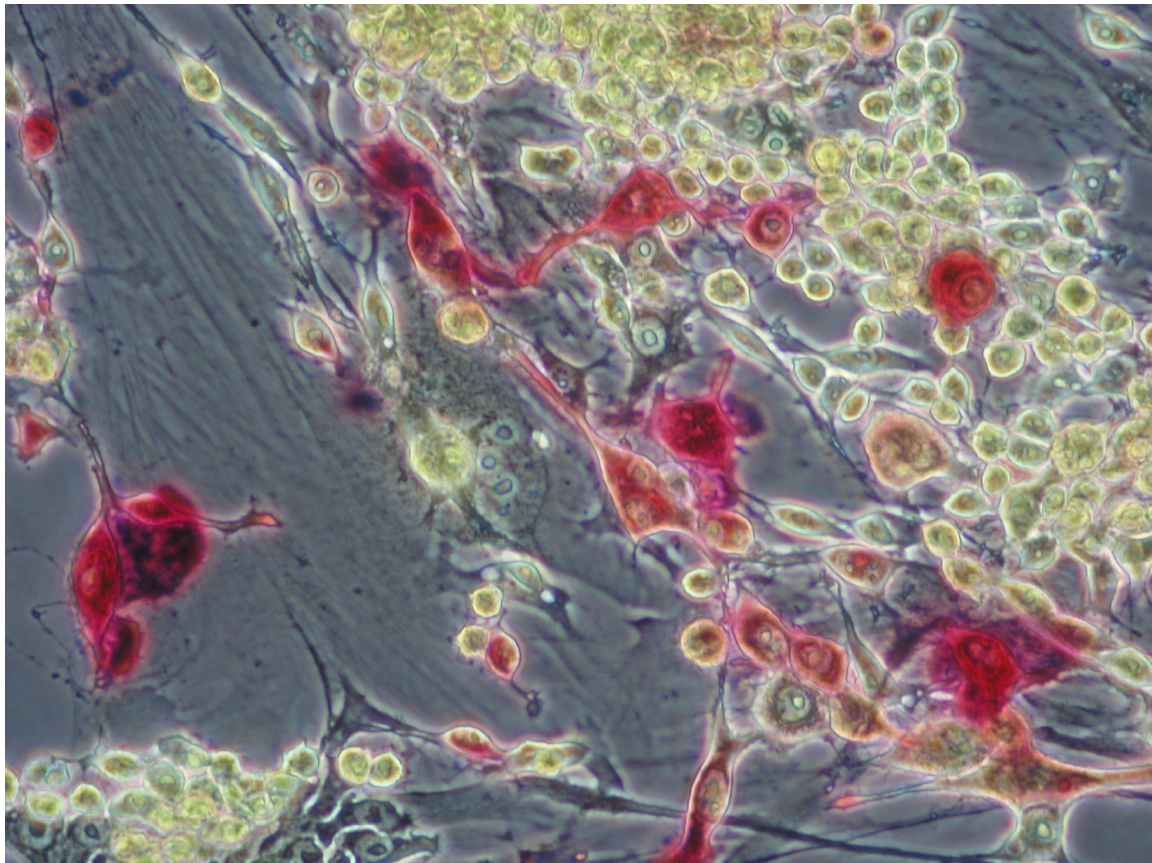


Abb. 34: Rotgefärbte osteoklastenähnliche Zellen in der Co-Kultur von PDL-Zellen (spindelförmig) und RAW 264.7-Zellen (rund) (TRAP,  $\times 400$ ).

## 5 Diskussion

Die vorliegende Dissertation untersucht die Auswirkung mechanischer Kraftapplikation im Bereich kieferorthopädischer Therapien auf die Zellen des parodontalen Ligaments bei gleichzeitigem Vorhandensein parodontal-pathogener Keime. Die Initiative für diese Studie ergab sich aus der Untersuchung der Struktur der Alterspyramide, die eine starke Zunahme einer immer älter werdenden Population in der Gesellschaft prognostiziert. Im Hinblick auf die steigende Lebensqualität in den meisten europäischen Industrienationen wächst bei älteren Menschen der Wunsch nach einem ästhetischen und lang anhaltenden jugendlichen Erscheinungsbild. Dieser Trend zeigt sich auch in der gegenwärtigen Zahnmedizin, besonders aber in der Kieferorthopädie. Deshalb entscheiden sich immer mehr ältere Patienten für kieferorthopädische Behandlungsmaßnahmen, um Kiefer- und Zahnfehlstellungen zu regulieren und dadurch die Kaufunktion, die Mundhygiene und vor allem das ästhetische Auftreten zu optimieren. Häufig zeigen aber diese Patienten bei der klinischen Untersuchung parodontale Problematiken auf. Wie eine Studie von Micheelis und Schiffner (2006) belegt, liegen bei Patienten im Alter von 15 Jahren bei 14% erhöhte Sondierungstiefen ( $> 3,5$  mm) vor. Bei den Patienten im Alter von 35 bis 44 Jahren sind es bereits 74% und bei den 65 bis 74-Jährigen sogar 88%. Die Ursachen dafür sind das Vorhandensein supra- und subgingivaler bakterieller Plaque.

Obwohl eine kieferorthopädische Behandlung o.g. Vorteile bewirkt und dadurch die orale Situation verbessert, kann sie aber in Anwesenheit bestimmter parodontal-pathogener Keime (Kajiya et al., 2010) zu negativen Auswirkungen auf den Zahnhalteapparat und den Kieferknochen führen (Sanders, 1999; Dannan, 2010). Zudem ist bei festsitzenden Apparaturen die Mundhygiene erschwert (Sander, 2011). In Folge treten bei nicht ausreichender Hygiene verstärkt Plaquebildung und Entzündungsreaktionen auf.

Da im vorliegenden Schriftum der Zusammenhang zwischen der Wirkung von kieferorthopädischer Kraftapplikation in Anwesenheit von parodontal-pathogener Keime auf PDL-Zellen und auf das Remodelling des Kieferknochens nur unzureichend untersucht ist, war es unser Anliegen, den vorliegenden Sachverhalt im Hinblick auf die Expression von Knochenmetabolismus regulierenden Genen wie OPG und RANKL zu erforschen. Es wurden entsprechende Versuchsaufbauten vorbereitet und mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Fusobacterium nucleatum* zwei besonders potente Ver-



treter parodontal-pathogener Keime ausgewählt. Zusätzlich wurde das Verhalten der PDL-Zellen, wenn sie einmal nur mit parodontal-pathogenen Keimen und analog nur mit mechanischer Kraftapplikation behandelt wurden, untersucht.

## **5.1 Diskussion der Methoden**

In dieser Studie wurde das Verhalten von PDL-Zellen auf diverse äußere Stimulationen untersucht. PDL-Zellen waren ideal für Untersuchungen von pathologischen Einflüssen auf das Parodontium geeignet, da sie fibroblastische und osteoblastische Aufgaben in diesem haben (Somerman et al., 1990). Zudem sind sie leicht kultivierbar und durch ihre charakteristische Morphologie (Jönsson et al., 2011) und ihr Expressionsmuster identifizierbar (Somerman et al., 1990). Kanzaki et al. (2002) beschrieben das mögliche Vorkommen von Osteoblasten in der PDL-Zellkultur. Diese seien in der Lage, mechanischen Stress auf Population der PDL-Zellen zu übertragen. Wie Kanzaki et al. (2002) vernachlässigten wir in unserem Experiment den möglichen Einfluss anderer Zelltypen auf die PDL-Zellen, da vorliegende PDL-Zellpopulation ebenfalls größtenteils aus spindelförmigen Fibroblasten bestand.

Wir entschieden uns, die PDL-Zellen von Weisheitszähnen junger Patienten (14 bis 22 Jahre) zu gewinnen. In Vorversuchen proliferierten die PDL-Zellen junger Patienten stärker als die PDL-Zellen erwachsener Patienten. Diese zeigten einen seneszenten Charakter und proliferierten langsamer. Zudem konnte bei den Weisheitszähnen junger Patienten im Gegensatz zu denen älterer Patienten eine längere Kontamination mit Keimen der Mundhöhle und somit pathologische Vorgänge ausgeschlossen werden (Kraus und Mitarb., 2012). Zähne erwachsener Patienten erwiesen sich bei Vorversuchen in der Kultivierung als problematisch, da die Kulturen durch Hefepilze etc. verunreinigt waren. Auch in anderen Studien wurden PDL-Zellen von den Zähnen junger Patienten entnommen (Yamaguchi et al., 2006; Kraus und Mitarb., 2012).

Der Versuchsaufbau wurde nach Vorbild ähnlicher Studien aufgebaut, allerdings mit mehreren Versuchsgruppen (d.h. unbehandelt; mit Druck 2 g/cm<sup>2</sup>; mit parodontalen Keimen; mit Druck 2 g/cm<sup>2</sup> und parodontalen Keimen). Andere Studien beobachteten nur einen Faktor, wie den der mechanischen Kraftapplikation (Kanzaki et al., 2002; Li et al., 2011) oder den der parodontal-pathogenen Keime (Krajewski et al., 2009; Belibasakis und Mitarb., 2011). Einzig die Studie von Yamamoto et al. 2011 berücksichtigte beide Einflüsse. Wir entschieden uns deshalb im Gegensatz zu den anderen Studien für

eine immer gleich bleibende Kraftapplikation von 2 g/cm<sup>2</sup> auf die PDL-Zellen, wie sie auch bei einer festsitzenden kieferorthopädischen Apparatur vorkommt. Zudem beschrieben Kanzaki et al. (2002), dass kleinere Kräfte einen zu geringen Effekt hätten und größere Kräfte die Zellen schädigen würden. Auch die Dauer wurde auf 96 h festgelegt, da die Studie von Li et al. (2011) größere Expressionswerte angab, je länger das Experiment durchgeführt wurde. Wir hielten diese Dauer für angemessen und aussagekräftig, da Vorversuche mit nur 24 h Behandlung nur kleine Effekte aufzeigten. Die Applikation des Druckes wurde nach der Methode von Kanzaki et al. (2002) durchgeführt. Als Bakterien wurden mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Fusobacterium nucleatum* zwei aggressive parodontal-pathogene Keime ausgewählt (Hellwig und Mitarb., 2009). Bei der Kultivierung der Bakterien wurde im Rahmen der Qualitätssicherung auf die gleiche Behandlung geachtet. Die Anzucht erfolgte nach der Methode von Sun et al. (2010), da diese Studie sehr gute Ergebnisse in Bezug auf die Aktivierung der toll-like-Rezeptoren und auf die Expression anderer Zytokine vorweisen konnte. Deshalb wurde diese Methode als geeignet für unser Experiment betrachtet.

Die Auswertung mittels einer RT-PCR ist eine anerkannte und viel praktizierte Methode, um die Amplifizierung der Gene pro Zyklus genau verfolgen und die Gene quantifizieren zu können (Holzapfel und Wickert, 2007). Wir wählten sie zur Auswertung aus, da diese Methode eine Basisdiagnostik bei molekularen Untersuchungen ist und auch bei den meisten vergleichbaren Studien zur Messung eingesetzt wurde (Belibasakis und Mitarb. 2011; Yamamoto et al. 2011).

Zur weiteren Quantifizierung von RANKL führten wir einen ELISA-Nachweis durch. Diese Methode eignete sich in der Studie von Kanzaki et al. (2002) gut zum Nachweis von Prostaglandin E<sub>2</sub> und in der Untersuchung von Sun et al. (2010) zum Nachweis von Zytokinen. Unser Ziel war es, mittels dieser Methode sRANKL im Überstand zu messen und es weiter zu quantifizieren. Da dieser Versuch nicht zum Erfolg führte, wiesen wir die Produktion von mRANKL im Gesamtprotein aus PDL-Zellen mittels eines Western-Blots nach. Kanzaki et al. (2002), Yamaguchi et al. (2006) und Okamoto et al. (2009) nutzten ebenfalls den Western-Blot zur weiteren Quantifizierung der Zytokine.

Um die Wirkung von RANKL zu überprüfen, wurde mit dem Osteoklastendifferenzierungsassay letztlich ein indirektes Verfahren angewandt, bei dem eine Co-Kultur von RAW 264.7-Zellen und PDL-Zellen angelegt wurde. Lossdörfer und Mitarb. (2011) beschrieben die besondere Eignung der RAW 264.7-Zellen für dieses Experiment, da

sie RANKL-sensitiv sind und nach Behandlung mit diesem Gen sich mittels einer TRAP-Färbung anfärben lassen. Die TRAP-Färbung ermöglichte den Nachweis der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase, welche ein spezifisches Merkmal von Osteoklasten ist (Lossdörfer und Mitarb., 2011). Auf Grund dieser Eigenschaft waren sowohl die Zellen als auch die Methode sehr geeignet für unsere Untersuchung. Obwohl die RAW 264.7-Zellen murinen Ursprungs sind und diese Tatsache von Nachteil sein könnte, zeigten Lossdörfer und Mitarb. (2011), dass es sich dabei um ein fest etabliertes und reproduzierbares Modell handelt. Weiterhin bestätigten diese Autoren, dass die TRAP-Färbung eine anerkannte standardmäßige Nachweismethode von mehrkernigen osteoklastenähnlichen Zellen ist. Lossdörfer und Mitarb. (2011) verdeutlichten, dass die Mehrkernigkeit der Zellen ein Charakteristikum von Osteoklasten ist und diese mittels Lichtmikroskopie detektiert werden kann. Deshalb nutzten wir ebenfalls die TRAP-Färbung zur Markierung der osteoklastenähnlichen Zellen aus unserem Co-Kultur Experiment.

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

Bei der genauen Untersuchung der PDL-Zellen konnten wir die typische spindelförmige Morphologie der PDL-Zellen unter dem Lichtmikroskop erkennen, wie Jönsson et al. (2011) beschrieben, und über die PCR die Expression fibroblastischer und osteoblastischer Gene nachweisen. Somerman et al. (1990) belegten, dass PDL-Zellen in der Lage sind, fibroblastische Gene (z.B. Fibromodulin) zu exprimieren. Diese Auffassung teilen wir. Des Weiteren bestätigte er durch seine Forschungsergebnisse die Beteiligung der PDL-Zellen an der Produktion der extrazellulären Matrix (Kollagen). In der gleichen Studie zeigte er die Expression von typischen osteogenen Genen wie ALP, BSP, OPG, RANKL und RUNX2. Das Ergebnis bestätigte Arceo et al. (1991). Somerman et al. (1990) und Arceo et al. (1991) demonstrierten in ihren Untersuchungen, dass PDL-Zellen wichtige Aufgaben haben. Sie sind durch ihr Expressionsmuster am Aufbau der extrazellulären Matrix und am Remodelling des Kieferknochens beteiligt. Yamaguchi et al. (2009) legten eine Beteiligung der PDL-Zellen an der körpereigenen Immunantwort dar.

Unsere Ergebnisse wiesen die Expression von OPG und RANKL in allen Versuchsgruppen nach. Allerdings waren - je nach Art der Behandlung - die Expressionen dieser Gene von unterschiedlichem Ausmaß.

Die Ergebnisse der normalisierten Genexpression von OPG und RANKL in den unbehandelten Gruppen ergaben ähnliche Werte. Deshalb wurde die Vermutung bestätigt, dass PDL-Zellen basal immer eine Grundmenge der beiden genannten Gene exprimieren. Das RANKL/OPG-Verhältnis war bei allen unbehandelten Versuchsgruppen - mit nur minimalen Unterschieden - ebenfalls sehr konstant. Dadurch zeigte sich ein physiologisches Verhältnis von RANKL zu OPG ohne Einwirkung äußerer Einflüsse. Dieser Sachverhalt bestätigte die Beeinflussung des physiologischen Knochenumbaus durch PDL-Zellen und die Abhängigkeit dessen von dem Verhältnis von RANKL und OPG. Die Ergebnisse korrelierten mit der Studie von Kanzaki et al. (2002), Belibasakis und Mitarbeitern (2011) sowie mit der Studie von Kraus und Mitarbeitern (2012).

Eine Veränderung des RANKL/OPG-Systems zeigte sich durch das Anlegen einer kontinuierlichen mechanischen Kraft auf die PDL-Zellen, wie sie für kieferorthopädische Behandlungen angewandt wird. Dies bewirkte sowohl eine Zunahme der Expression von OPG aber auch eine deutliche Zunahme der Expression von RANKL. Den Anstieg der Expression von RANKL auf Grund mechanischer Kraftapplikation zeigten bereits mehrere Forschergruppen (Kanzaki et al., 2002, Yamaguchi et al., 2006) in ähnlichen Studien. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen verzeichneten diese allerdings einen Rückgang der Expression von OPG. Wie Yamaguchi (2009) darlegte, wird bei Einwirkung von kieferorthopädischen Kräften auf den Zahn und somit auf die PDL-Zellen eine biochemische Signalkaskade aktiviert, die einem Entzündungsprozess ähnlich ist. Dieser Vorgang führt auf Grund der Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Entzündungsmediatoren (Yamamoto et al., 2011) zur Freisetzung der Tumornekrosefaktoren OPG, RANK und RANKL (Yamamoto et al., 2006). Diese Gene, vor allem aber das Verhältnis von RANKL zu OPG sind zentraler Bestandteil der Osteoklastogenese und führen zur weiteren Differenzierung von Osteoklasten (Kanzaki et al., 2002; Yamaguchi et al., 2006). Dieses Verhältnis war bei uns ebenfalls deutlich erhöht im Vergleich zu der physiologischen Grundexpression. Daraus ließ sich trotz der Hochregulierung beider Gene schließen, dass die mechanische Kraftapplikation an PDL-Zellen insgesamt eine stärkere Expression von RANKL als von OPG zur Folge hatte. RANKL und OPG sind Antagonisten im Regulationsprozess des Knochenremodellings (Hofbauer und Schoppet, 2006). Deshalb führt das erhöhte RANKL/OPG-Verhältnis zu einem verstärkten Abbau der Knochensubstanz. In der Folge verläuft deshalb am Patienten die Zahnbewegung in Richtung der Abbauzone. Kieferorthopädische Kraftapplikation führt in der Druckzone – die Knochenseite, in die der Zahn bewegt wird - zu einem

Abbau des Kieferknochens nach o.g. Muster (Kahl-Nieke, 2010). In der Zugzone – die Seite des Knochens von der der Zahn wegbewegt wird - erfolgt dagegen eine Apposition von Knochen. Garlet et al. (2007) wiesen eine erhöhte RANKL und eine geringere OPG-Expression im Bereich der Druckzone nach. Für die Zugzone zeigten Garlet et al. (2007) eine geringere Expression von RANKL, aber dafür eine erhöhte Transkription von OPG. Diese Ergebnisse bestätigten die klinischen Beobachtungen von Kahl-Nieke (2010).

Analog zur Wirkung von mechanischem Stress auf die PDL-Zellen während der kieferorthopädischen Zahnbewegung sind auch Bakterien in der Lage, die PDL-Zellen zu stimulieren. Almasri et al. (2007), Souza et al. (2010) und Sun et al. (2010) eruierten, dass Lipopolysaccharide der bakteriellen Zellwände eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Die pathogenen Stoffe werden dabei von toll-like-Rezeptoren erkannt und aktivieren über den TLR-Signalweg die PDL-Zellen. Diese reagieren genau wie bei der Einwirkung von kieferorthopädischen Kräften mit der Auslösung einer Signalkaskade, an deren Ende eine gesteigerte Bildung von proinflammatorischen Zytokinen und RANKL besteht.

Unsere Daten bestätigten diese Vermutung, dass bakterielle Lipopolysaccharide und kieferorthopädische Apparaturen zu einer Auslösung der genannten Signalkaskade führen. In einer ersten Studie verglichen wir die unterschiedlichen Genexpressionen einer mit parodontal-pathogenen Keimen behandelten PDL-Zellkultur mit den Werten einer mit mechanischem Stress behandelten PDL-Zellkultur. Sämtliche andere Studien (s.u.) beschäftigten sich immer nur mit einer der beiden Behandlungen. Wir konnten herausfinden, dass die Behandlung mit den Keimen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Fusobacterium nucleatum* eine geringe Hochregulation von OPG im Vergleich zur unbehandelten Gruppe bewirkte. Im Gegensatz dazu war die Expression von RANKL deutlich stärker und damit auch das RANKL/OPG-Verhältnis höher als bei der unbehandelten Gruppe. Im Vergleich der beiden Bakterien provozierte *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* eine stärkere Expression von OPG und RANKL. Dementsprechend wiesen die mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* behandelten Proben ein höheres RANKL/OPG-Verhältnis auf als bei Behandlung mit *Fusobacterium nucleatum*. Dieser Sachverhalt könnte ein Indiz für eine höhere Pathogenität des Erstgenannten und eine höhere Aggressivität in Bezug auf Parodontopathien sein. Vergleichbare Studien führten diesen Versuch vornehmlich mit den Keimen *Porphyromonas gingivalis* (Beli-

basakis et al., 2007; Krajewski et al., 2009; Sun et al., 2010; Yamamoto et al., 2011) und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Tiranathagul et al., 2004; Belibasakis et al., 2005; Sun et al., 2010) durch. Zudem legten Kajiya et al. (2010) ein Review zur Rolle von parodontal-pathogenen Keimen beim Knochenabbau, sowie Belibasakis und Mitarb. (2011) eine Studie zur Wirkung des oralen Biofilms auf PDL-Zellen vor. Alle diese Studien zeigten ebenfalls eine Hochregulation von RANKL in den PDL-Zellen sowie in der Folge eine Vergrößerung des RANKL/OPG-Verhältnisses. Allerdings variierten die Ergebnisse in Bezug auf die Expression von OPG. Während die Studie von Belibasakis und Mitarb. (2011) unsere Ergebnisse mit einer Steigerung der Genexpression von OPG stützte, zeigten mehrere Studien (Tiranathagul et al., 2004; Belibasakis et al., 2007) einen Abfall der OPG Expression. Kajiya et al. (2010) wertete beide Möglichkeiten als vorstellbar, solange das Verhältnis von RANKL zu OPG insgesamt hochreguliert wird. Wada et al. (2004) legten dar, dass bakterielle Lipopolysaccharide die PDL-Zellen zur Expression von RANKL und OPG über IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  stimulieren können. Alle Studien waren sich einig, dass das auf Grund bakterieller Stimulation gestiegene RANKL/OPG-Verhältnis die Präosteoklasten zur Differenzierung anregt und in der Folge der Knochen abgebaut wird. Unsere Ergebnisse bestätigten die These von Krajewski et al. (2009) nochmals.

Auf der Basis der Ergebnisse aus der Behandlung der PDL-Zellen mit mechanischem Stress oder mit parodontal-pathogenen Keimen vermuteten wir auch eine deutliche Zunahme der Expression von OPG und RANKL in den mit beiden Einflüssen behandelten Proben. In den vorangegangenen Studien wurde bisher lediglich durch Yamamoto et al. (2011) die Wirkung von mechanischem Stress und dem Parodontalkeim *Prophyromonas gingivalis* auf PDL-Zellen beschrieben. Dabei wurde die Veränderung der Genexpression von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  beobachtet. Yamamoto et al. (2011) konnten beweisen, dass die genannten Zytokine rein unter mechanischer Kraftapplikation verstärkt exprimiert wurden. Diese Beobachtung konnten wir in Bezug auf OPG und RANKL bestätigen (s.o.). Yamamoto et al. (2011) erkannten bei analoger Stimulation der PDL-Zellen mit mechanischem Stress und *Prophyromonas gingivalis* eine sehr viel stärkere Expression von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  als es bei reiner Behandlung mit mechanischem Stress der Fall war. Unsere Ergebnisse decken sich mit der von Yamamoto et al. (2011) aufgestellten Vermutung. In einer ersten Studie beschrieben wir die Wirkung einer Co-Stimulation von zwei verschiedenen Bakterien und mechanischem Stress auf PDL-Zellen. Diese führte zu einer Erhöhung der OPG Expression. Bei RANKL kam es

im Verhältnis zu den anderen Versuchsgruppen zu einer massiven Hochregulierung. In der Folge war auch das RANKL/OPG-Verhältnis um ein Vielfaches im Vergleich zu der unbehandelten Versuchsgruppe und zu den restlichen behandelten Versuchsgruppen gesteigert. Beide Studien lassen darauf schließen, dass diese kombinierte Reizung der PDL-Zellen eine deutliche Expression proinflammatorischer Zytokine bewirkt. Die PDL-Zellen reagieren auf diese Stimulation mit einer sehr starken Expression osteoblastischer Gene (OPG, RANKL) und induzieren wiederum die Differenzierung der Präosteoklasten. Die Folge ist ein massiver Knochenabbau in den betroffenen Arealen. Die Ergebnisse lassen uns auch vermuten, dass der Knochenabbau bei kombinierter Stimulation der PDL-Zellen schneller voranschreitet als bei einer Reizung mit nur einer Komponente. Wir stellten außerdem fest, dass die mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und mechanischem Stress behandelten PDL-Zellen eine noch höhere Transkription von OPG und RANKL und somit auch ein viel größeres RANKL/OPG-Verhältnis aufwiesen als die mit *Fusobacterium nucleatum* und mechanischem Stress behandelten Proben. Wie bereits o.g. legte dieser Sachverhalt wieder die Vermutung einer höheren Pathogenität und Aggressivität von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* im Vergleich zu *Fusobacterium nucleatum* nahe. Yamamoto et al. (2011) stellten die These auf, die Entzündungsreaktionen würden hauptsächlich durch parodontal-pathogene Keime induziert und durch mechanischen Stress zusätzlich unterstützt. Die Auffassung, dass hauptsächlich Keime die Reaktionen hervorrufen, konnten wir nicht nachvollziehen, da die mit mechanischem Stress behandelten Gruppen immer höhere Expressionswerte von RANKL und OPG und höhere RANKL/OPG-Verhältnisse als die mit Keimen behandelten Gruppen aufwiesen. Darum war zu vermuten, dass sich beide Einflussfaktoren in gleicher Weise potenzieren. Insgesamt konnten wir aber zeigen, dass beide Faktoren sich gegenseitig potenzieren und zusammen zu viel höheren Genexpressionen in PDL-Zellen führen als wenn sie alleine auf PDL-Zellen einwirken.

Mittels eines ELISA-Nachweises gelang es uns nicht, lösliches RANKL (sRANKL) im Überstand der verschiedenen Versuchsgruppen nachzuweisen. Deshalb isolierten wir das Gesamtprotein aus allen Proben und führten mit Hilfe eines Western-Blots einen semiquantitativen Nachweis von OPG und RANKL durch. In diesem Fall war RANKL allerdings eindeutig nachweisbar. Demnach vermuteten wir, dass PDL-Zellen nur membranassoziiertes RANKL (mRANKL) und kein lösliches RANKL bilden und exprimieren können. Kajiya et al. (2010) waren ebenfalls dieser Ansicht. Um diese These über die Bildung von RANKL weiter zu quantifizieren, wurde ein indirektes Verfahren

(Osteoklastendifferenzierungsassay) mit einer Co-Kultur von PDL- und RAW 264.7-Zellen durchgeführt. In diesem Experiment konnte eindeutig das Ergebnis des Western-Blots anhand der Anzahl der mehrkernigen TRAP-positiven osteoklastenähnlichen Zellen (Lossdörfer und Mitarb., 2011) bestätigt werden. Die Ergebnisse entsprachen genau unseren Erwartungen und zeigten wieder, dass mechanischer Stress und parodontal-pathogene Keime PDL-Zellen stimulieren und somit die Osteoklastogenese anregen. Wir konnten auch unsere vorherige Vermutung weiter bestätigen, dass die beiden Einflussfaktoren zusammen im Zahnhalteapparat eine stärkere Differenzierung von Osteoklasten provozieren als jeder Faktor für sich allein. Dieses indirekte Nachweisverfahren verifiziert die Bildung von membranassoziiertem RANKL durch die PDL-Zellen. Allerdings wird die Potenz von den PDL-Zellen, neben mRANKL auch sRANKL zu exprimieren, in der Literatur sehr kontrovers diskutiert. Alle Autoren waren sich einig, dass RANKL in diesen zwei Formen existiert (Blair et al., 2007; Pérez-Sayáns et al., 2010; Belibasakis und Mitarb., 2011) und PDL-Zellen mRANKL exprimieren können (Belibasakis und Mitarb., 2011). Zudem erforschten Nakashima et al. (2000), dass membranassoziiertes RANKL eine höhere Potenz in Bezug auf die Osteoklastogenese hat als lösliches RANKL. Belibasakis und Mitarb. (2011) vermuteten, PDL-Zellen würden die membrangebundene Metalloprotease TACE produzieren. Die Forscher behaupteten weiterhin die Protease sei in der Lage membrangebundene Zytokine (v.a. RANKL) mit ihren enzymatischen Eigenschaften zu mobilisieren. Kanzaki et al. (2010) verifizierten das Vorkommen der Protease TACE und ihr Potential RANKL von der Membran zu lösen und als sRANKL freizusetzen. Kanzaki et al. (2010) wiesen diesen Ablauf nur für B- und T-Lymphozyten nach. Lee et al. (2011) fanden auch für Osteoblasten die Expression von TACE somit auch die Produktion von sRANKL heraus. Belibasakis und Mitarb. (2011) schrieben auch in ihrer Studie den PDL-Zellen diese Fähigkeit zu, nachdem sie Expression von TACE in diesen Zellen messen konnten. Krajewski et al. (2009) konnten in ihrer Studie über Einfluss von bakteriellen Lipopolysacchariden auf die Expression von RANKL und OPG ebenfalls exprimiertes sRANKL nachweisen und vermuteten dahinter ebenfalls die Wirkung von TACE in PDL-Zellen. Für PDL-Zellen konnten Hormdee et al. (2005) keinen derartigen Vorgang nachweisen. In unserer Studie wurden auch keine Anhaltspunkte für diesen Sachverhalt gefunden, da wir keine Expression von sRANKL feststellten. Allerdings wäre es für weitere Studien von Interesse, den Gehalt an TACE in PDL-Zellen zu messen.



Zusammenfassend zeigten wir, dass mechanische Kraftapplikation und parodontal-pathogene Keime in PDL-Zellen Entzündungsreaktionen auslösen konnten, was durch die verstärkte Expression von OPG und RANKL und das erhöhte RANKL/OPG-Verhältnis deutlich wurde. Wirkten beide Ereignisse zusammen auf die PDL-Zellen ein, so ergab sich daraus eine vielfach höhere Expression der genannten Gene als wenn sie alleine auf die PDL-Zellen einwirkten. Aus dem hochregulierten RANKL/OPG-Verhältnis resultierte nach unseren Ergebnissen eine vermehrte Differenzierung von Monozyten zu mehrkernigen TRAP-positiven osteoklastenähnlichen Zellen in der RAW 264.7/PDL-Zellkultur. Als Konsequenz ließ sich ein gesteigerter Knochenabbau in den betroffenen Arealen vermuten. Zudem besaßen die PDL-Zellen die Fähigkeit, mRANKL zu exprimieren. Für die Expression von sRANKL waren keine Anhaltspunkte zu finden.

### **5.3 Konsequenzen für den klinischen Alltag**

Die Studie zeigt das hohe Gefahrenpotential, welches eine kieferorthopädische Behandlung für ältere Patienten mit parodontaler Problematik in sich birgt. Unsere Erfahrungen decken sich mit klinischen Studien, z.B. mit der Untersuchung von Okamoto et al. (2009) an Mäusen, dass kieferorthopädische Therapien im parodontal geschädigten Gebiss zu einer Entzündungsreaktion im Desmodont mit anschließender Aktivierung der Osteoklastogenese führen.

Daher sollten bei Patienten mit dem Wunsch nach Regulierungen im Bereich der Zähne immer eine ausführliche allgemeine Anamnese und eine gründliche intraorale Inspektion stattfinden, um Allgemeinerkrankungen und potentielle Gefahrenherde zu erkennen (Sander, 2011).

Wir konnten - wie bereits Schwarz (1961) - erkennen, dass bei dem Anlegen von kieferorthopädischen Kräften für Patienten aller Altersgruppen eine dosierte Applikation stattfinden muss, da es sonst zu einer irreversiblen Schädigung des Zahnhalteapparats und des anliegenden Alveolarknochens kommt. Daher ist ein schonendes Anlegen von Kräften unter kontinuierlicher kieferorthopädischer Kontrolle indiziert (Sander, 2011). In vielen Lehrbüchern wird der Frage nachgegangen, ob pathologische Habits wie Bruxismus den gleichen Einfluss wie zu starke kieferorthopädische Kräfte auf den Zahnhalteapparat haben könnten (Hellwig und Mitarb., 2009). Diese Theorie ist sehr umstritten. Allerdings ist es nach unseren Ergebnissen durchaus vorstellbar, dass ein langes beste-

hen von okklusalen Kräften auf die Zähne zu Knochen- bzw. Wurzelresorptionen führen könnte. Daher sollten auch derartige Habits vor einer KFO-Therapie unbedingt behandelt werden, um irreversiblen Schädigungen vorzubeugen (Hellwig und Mitarb., 2009). Wenn Patienten mit bereits bestehender parodontaler Problematik (d.h. aktive Taschen auf Grund bakterieller Invasion) eine KFO-Therapie wünschen, ist besondere Vorsicht geboten. Nach unseren Studien und nach Lehrbuchmeinungen (Hellwig und Mitarb., 2009; Gängler und Mitarb. 2010) sind diese Patienten allein schon wegen der bakteriellen Keimbesiedelung von Entzündungsreaktionen und Knochenabbau betroffen. Wie unsere Studie zeigt, käme es zu einem vielfach beschleunigten Knochenverlust, wenn zu der bakteriellen Belastung auch noch kieferorthopädische Kräfte appliziert würden. Eine kieferorthopädische Therapie darf daher erst nach einem erfolgreichen konservierendem und evtl. chirurgischen Vorgehen eingeleitet werden (Hellwig und Mitarb., 2009). Die konservierende Behandlung beinhaltet eine Umstellung der Mundhygiene des Patienten, eine Beseitigung aktiver kariöser Läsionen und endodontischen Problematiken, sowie eine saubere Kürettage und Reinigung des Zahnes und der Zahnwurzeln ggf. mit Antibiose. Außerdem müssen allgemeinmedizinische Risiken umgehend therapiert werden. Die Behandlung muss eine vollständige Ausheilung der Problemzonen und eine gute Compliance des Patienten bewirken. Erst unter stabilen Verhältnissen darf eine Therapie begonnen werden (Hellwig und Mitarb., 2009).

Abschließend zeigt unsere Studie für den klinischen Alltag, dass eine besondere Vorsicht va. bei älteren Patienten (Risikofaktoren: Parodontitis, Allgemeinkrankungen) geboten ist, um nicht aus einer ästhetischen Korrektur ein großes ästhetisches Problem zu induzieren. Darum ist eine ausführliche Anamnese und Inspektion unabhängig vom Wunsch und Alter des Patienten unabdingbar. Bei allen Patienten muss die Behandlung unbedingt schonend und stetig kontrolliert verlaufen, um einen guten Erfolg zu erreichen und bei auftretenden Problemen sofort intervenieren zu können.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden *in vitro* Studie wurde die Wirkung von mechanischer Kraftapplikation auf die Expression der Gene OPG und RANKL von PDL-Zellen in Anwesenheit parodontal-pathogener Keime untersucht.

Dazu wurden die PDL-Zellen aus dem mittleren und unteren Wurzeldrittel von den aus medizinischen Gründen extrahierten Weisheitszähnen von Patienten im Alter von 14 bis 22 Jahren isoliert und kultiviert. Die PDL-Zellen wurden morphologisch mittels Lichtmikroskopie und wegen ihrem speziellen Expressionsmuster mittels PCR als solche verifiziert.

Nach der Anzüchtung wurden vier Versuchsgruppen angelegt, die wie folgt behandelt wurden:

Gruppe 1: Kontrollgruppe ohne Druck, ohne Bakterienzusatz

Gruppe 2: Gruppe mit Druck (2 g/cm<sup>2</sup>), ohne Bakterienzusatz

Gruppe 3: Kontrollgruppe ohne Druck, mit Bakterienzusatz

Gruppe 4: Gruppe mit Druck (2 g/cm<sup>2</sup>), mit Bakterienzusatz

Der Druck von 2 g/cm<sup>2</sup> wurde kontinuierlich nach der Methode von Kanzaki et al. (2002) mittels Glaszylindern ausgeübt, welche eine Dicke von 7,8 mm, einen Durchmesser von 33 mm und eine Masse von 17,44 g aufwiesen. Als Bakterien wurden die parodontal-pathogenen Keime *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Fusobacterium nucleatum* verwendet. Die Versuchsgruppen wurden 96 h inkubiert.

Die Auswertung und Quantifizierung der Expression von OPG und RANKL erfolgte mittels RT-PCR, ELISA, Western-Blot und Osteoklastendifferenzierungsassay.

Wir konnten zeigen, dass die Applikation einer Kraft (2 g/cm<sup>2</sup>) genauso wie der Zusatz von Bakterien eine erhöhte Expression von OPG und RANKL im Vergleich zu deren physiologischer Expression aus den PDL-Zellen zur Folge hat. Die Behandlung mit Druck bewirkte ein höheres RANKL/OPG Verhältnis als die Stimulation mit Bakterien. Die kombinierte Behandlung aus Druck und parodontalen Keimen zeigte die stärkste Hochregulierung des RANKL/OPG-Verhältnisses. Die Studie legte zusätzlich in einem Co-Kultur-Experiment aus PDL- und RAW 264.7-Zellen die stimulierenden Auswirkungen der veränderten RANKL/OPG-Verhältnisse auf die Osteoklastogenese dar.

Die gewonnenen Werte ließen auf die Wirkung kieferorthopädischer Therapien und pathologischer Einflüsse auf den Zahnhalteapparat und den Kieferknochen schließen. Daraus konnten wir vermuten, dass sowohl kieferorthopädische aber auch parafunktionelle okklusale Kräfte über längere Zeit einen Knochenabbau induzieren. Zusätzlich konnte die inflammatorische Wirkung parodontal-pathogener Keime in aktiven Taschen von Parodontitispatienten und die Korrelierung mit Knochenabbau gezeigt werden. Die Ergebnisse unterstützten die Auffassung, dass Patienten mit aktiven parodontalen Problemen keiner KFO-Behandlung unterzogen werden dürfen. Unsere Studie lässt vermuten, dass gerade diese Patienten von einer irreversiblen Schädigung des Zahnhalteapparates betroffen wären.

## 7. Literaturverzeichnis

Almasri A., Wisithphrom K., Windsor L.J., Olson B., 2007. Nicotine and lipopolysaccharide affect cytokine expression from gingival fibroblasts. J. Periodontol. 78, 533-541.

American Dental Hygienists' Association. Arachidonsäurestoffwechsel, Chicago.

URL: [http://www.adha.org/CE\\_courses/course15/art/jdh-sup172006-f001.jpg](http://www.adha.org/CE_courses/course15/art/jdh-sup172006-f001.jpg)

(Sichtungsdatum: 11.10.11)

Arceo N., Sauk J.J., Moehring J., Foster R.A., Somerman M.J., 1991. Human periodontal ligament cells initiate mineral-like nodules in vitro. J. Periodont. Res. 62, 499-503.

Basdra E.K., 1997. Biological Reactions to Orthodontic Tooth Movement. J. Orofac. Orthop. 58, 2-15.

Belibasakis G.N., Johansson A., Wang G., Chen C., Kalfas S., Lerner U.H., 2005. The cytolethal distending toxin induces receptor activator of NF-kappa B ligand expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. Infect. Immun. 103, 342-351.

Belibasakis G.N., Bostanci N., Hashim A., Johansson A., Aduse-Opoku J., Curtis M.A., Hughes F.J., 2007. Regulation of RANKL and OPG gene expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by *Porphyromonas gingivalis*: a putative role of the Arg-gingipains. Microb. Pathog. 43, 46-53.

Belibasakis G.N., Meier A., Guggenheim B., Bostanci N., 2011. Oral biofilm challenge regulates the RANKL-OPG system in periodontal ligament and dental pulp cells. Microb. Pathog. 50, 6-11.

Blair J.M., Zheng Y., Dunstan C.R., 2007. Molecules in focus: RANK ligand. Int. J. Biochem. Cell Biol. 39, 1077-1081.

Collin-Osdoby P., Yu X., Zheng H., Osdoby P., 2003. RANKL-Mediated Osteoclast Formation from Murine RAW 264.7 Cells. Meth. Molec. Med. 80, 153-166.

Dannan A., 2010. An update on periodontic-orthodontic interrelationships. J. Indian. Soc. Periodontol. 14, 66-71.

Delima A.J., Karatzas S., Amar S., Graves D.T., 2002. Inflammation and tissue loss caused by periodontal pathogen is reduced by interleukin-1 antagonists. J. Infect. Dis. 186, 511-516.

Diedrich P., 2000. Praxis der Zahnheilkunde Bd. 11/II – Kieferorthopädie II, 4. Aufl., Urban & Fischer Verlag, München.

Fukata M., Abreu M.T., 2008. Role of toll-like receptors in gastrointestinal malignancies. Oncogene 27, 234-243.

URL: [http://www.nature.com/onc/journal/v27/n2/fig\\_tab/1210908f2.html](http://www.nature.com/onc/journal/v27/n2/fig_tab/1210908f2.html)

(Sichtungsdatum: 10.11.11)

Gängler P., Hoffmann T., Willershausen B., Schwenzer N., Ehrenfeld M., 2010. Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie, 3. Aufl., G. Thieme Verlag, Stuttgart.

Garlet T.P., Coelho U., Silva J.S., Garlet G.P., 2007. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. Eur. J. Oral. Sci. 115, 355-362.

Graves D.T., Cochran D., 2003. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. J. Periodontol. 74, 391-401.

Heidemann D., Borchard R., Diedrich P., Eickholz P., Ehmke B., Flemmig Th., Fritz U., Günay H., Hillmann H., Hofmann Th., Kim M.Y., Kleber B.M., Lauer H.-Ch., Manolakis A., Merte K., Meyle J., Nentwig G.-H., Ottl P., Plagmann H.-Chr., Raetzke P., Ratka-Krüger P., Romanos G., Schacher B., Sculean A., Weigl P.M., 2005. Praxis der Zahnheilkunde Bd. 4: Parodontologie, 4. Aufl., Urban & Fischer Verlag, München.

Hellwig E., Klimek J., Attin T., 2009. Einführung in die Zahnerhaltung, 5. Aufl., Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln.

Hof H., Dörries R., 2005. Duale Reihe: Medizinische Mikrobiologie, 4. Aufl., G. Thieme Verlag, Stuttgart.

Hofbauer L.C., Schoppet M., 2006. Bedeutung von RANK-Ligand und Osteoprotegerin für den Knochenstoffwechsel, In: Ganten D., Ruckpaul K. (Hrsg.), Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 479-499.

Hofmann A., Mattyasovsky S.G., Brüning C., Ritz U., Mehling I., Meurer A., Rommens P.M., 2009. Osteoblasten – Zelluläre und molekulare Regulationsmechanismen in der Frakturheilung, Orthopäde 38, 1009-1019.

Holzapfel B., Wickert L., 2007. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Biol. unserer Zeit 37, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co., KGaA, Weinheim, 120-126.

Hormdee D., Nagasawa T., Kiji M., Yashiro R., Kobayashi H., Koshy G., Noguchi K., Nitta H., Ishikawa I., 2005. Protein kinase-A-dependent osteoprotegerin production on interleukin-1 stimulation in human gingival fibroblasts is distinct from periodontal ligament fibroblasts. Clin. Exp. Immunol. 142, 490-497.

Jönsson D., Nebel D., Bratthall G., Nilsson B.-O., 2011. The human periodontal cell: A fibroblastlike cell acting as an immune cell. J. Periodont. Res. 46, 153-157.

Kahl-Nieke B., 2010. Einführung in die Kieferorthopädie, 3. Aufl., Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln.

Kajiya M., Giro G., Taubmann M., Han X., Mayer M., Kawai T., 2010. Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. J. Oral. Microb. 2, 5532-DOI: 10.3402/jom.v2i0.5532.

Kanzaki H., Chiba M., Shimizu Y., Mitani H., 2001. Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition. J. Dent. Res. 80, 887-891.

Kanzaki H., Chiba M., Shimizu Y., Mitani H., 2002. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappa B ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. J. Bone Miner Res. 17, 210-220.

- Kanzaki H., Han X., Lin X., Kawai T., Taubman M.A., 2010. Is RANKL shedding involved in immune cell-mediated osteoclastogenesis?. *Interface Oral Health Sci.* 2009, 403-405.
- Katagiri T., Takahashi N., 2002 Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral. Dis.* 8, 147-159.
- Krajewski A.C., Biessei J., Kunze M., Maersch S., Perabo S., Noack M.J., 2009. Influence of lipopolysaccharide and interleukin-6 on RANKL and OPG expression and release in human periodontal ligament cells. *APMIS.* 117, 746-754.
- Kraus D., Jäger A., Abuduwali N., Deschner J., Lossdörfer S., 2012. Intermittent PTH (1-34) signals through protein kinase: A to regulate osteoprotegerin production in human periodontal ligament cells in vitro. *Clin. Oral. Invest.* 16, 611-618.
- Lee J.-H., Choi Y.-J, Heo S.-H., Lee J.-M., Cho J.-Y. 2011. Tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme (TACE) increases RANKL expression in osteoblasts and serves as a potential biomarker of periodontitis. *BMP. Rep.* 44, 473-477.
- Lehmann K., Hellwig E., 2005. *Zahnärztliche Propädeutik*, 10. Aufl., Urban & Fischer Verlag, München.
- Li Y., Zheng W., Liu J.-S., Wang J., Yang P., Li M.-L., Zhao Z.-H., 2011. Expression of Osteoclastogenesis Inducers in a Tissue Model of Periodontal Ligament under compression. *J. Dent. Res.* 90, 115-120.
- Linß W., Fanghänel J., 1999. *Histologie - Zytologie, Allgemeine Histologie, Mikroskopische Anatomie*, 1. Aufl., Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York.
- Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25, 402-408.
- Löffler G., Petrides P., 1997. *Biochemie und Pathobiochemie*, 5. Aufl., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.



Lossdörfer S., Götz W., Jäger A., 2011. PTH(1-34)-induced changes in RANKL and OPG expression by Human PDL cells modify osteoclast biology in a co-culture model with RAW 264.7 cells. Clin. Oral. Invest. 15, 941-952.

Micheelis W., Schiffner U., 2006. Vierte deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV). Neue Ergebnisse zu oralen Erkrankungsprävalenzen, Risikogruppen und zum zahnärztlichen Versorgungsgrad in Deutschland 2005. Deutscher Ärzte Verlag, Köln.

Müller H.-P., 2006. Checklisten der Zahnmedizin: Parodontologie, 2. Aufl., G. Thieme Verlag, Stuttgart.

Murphy K., Travers P., Walport M., 2009. Janeway Immunologie, 7. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 75ff.

Nakashima T., Kobayashi Y., Yamasaki S., Kawakami A., Eguchi K., Sasaki H., Sakai H., 2000. Protein expression and functional difference of membran-bound and soluble receptor activator of NF-kappa B ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. Biochem. Biophys. Res. Commun. 275, 768-775.

Nakashima K., Zhou X., Kunkel G., Zhang Z., Deng J.M., Behringer R.R., De Crombrughe B., 2002. The Novel Zinc-Finger Transcription Factor Osterix is required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. Cell Press 108, 17-29.

Novak M., 2006. Classification of Disease and Conditions Affecting the Periodontium. In: Newman M., Takei H., Klokkevold P., Carranza F. (eds): Carranza's Clinical Periodontology, 10th ed., Saunders, St. Louis.

Okamoto A., Ohnishi T., Bandow K., Kakimoto K., Chiba N., Maeda A., Fukunaga T., Miyawaki S., Matsuguchi T., 2009. Reduction of orthodontic tooth movement by experimentally induced periodontal inflammation in mice. Eur. J. Sci. 117, 238-247.

Pérez-Sayáns M., Somoza-Martín J.M., Barros-Angueira F., Rey J.M.G., García-García A., 2010. RANK/RANKL/OPG role in distraction osteogenesis. Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod. 109, 679-686.

Pschyrembel, 2004. Klinisches Wörterbuch, 260. Aufl., Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York.

Radlanski R.J., 2011. Orale Struktur- und Entwicklungsbiologie, Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin, Barcelona, Beijing, Chicago, Istanbul, Kopenhagen, London, Mailand, Moskau, Neu-Delhi, Paris, Prag, São Paulo, Seoul, Tokio, Warschau.

Rateitschak K.H., Rateitschak-Plüss E.M., Wolf H.F., 1984. Farbatlanten der Zahnmedizin 1 – Parodontologie, G. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Reitan K., 1967. Clinical and histologic observations on tooth movement during and after orthodontic treatment. Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop. 53, 721-745.

Reitan K., 1971. Comparative behavior of human and animal tissue during experimental tooth movement. Angle Orthod. 41, 1-14.

Sander F.G., 2011: Prophylaxe und Zahnpflege in der Kieferorthopädie. In: Sander F.G., Schwenzer N., Ehrenfeld M. (Hrsg.), Zahn-Mund-und Kieferheilkunde: Kieferorthopädie. 2. Aufl., G. Thieme Verlag, Stuttgart, 43-57.

Sanders N.L., 1999. Evidence-based care in orthodontics and periodontics: a review of the Literature. J. Am. Dent. Assoc. 130, 521-527.

Schendel K.U., Lohr A., Komposch G., 1994. Direktbesiedelung von Zahnhälsen mit Desmodontalfibroblasten – ein Schritt zur Erweiterung der Behandlungsmöglichkeiten in der Kieferorthopädie. Fortschr. Kieferorthop. 55, 126-131.

Schmittgen T.D., Livak K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C<sub>T</sub> method. Nature Protocols 3, 1101-1107.

Schumacher G.-H., 1991. Anatomie, Lehrbuch und Atlas, Bd. 1: Kopf, Orofaziales System, Auge, Ohr, Leitungsbahnen, 2. Aufl., Johann Ambrosius Barth, Leipzig, Heidelberg.

Schwarz A.M., 1961. Lehrgang der Gebissregulierung, Bd. 1 + 2. Urban & Schwarzenberg Verlag, Wien.

Somerman M.J., Young M.F., Foster R.A., Moehring J.M., Imm G., Sauk J.J., 1990. Characteristics of human periodontal ligament cells in vitro. Arch. Oral. Biol. 35, 241-247.

Souza P.P., Palmqvist P., Lundgren I., Lie A., Costa-Neto C.M., Lundberg P., Lerner U.H., 2010. Stimulation of IL-6 cytokines in fibroblasts by toll-like receptors 2. J. Dent. Res. 89, 802-807.

Strub J.R., Kern M., Türp J.C., Witkowski S., Heydecke G., Wolfart S., Alt K.W., Fischer J., Att W., 2011. Curriculum Prothetik Bd. 1: Geschichte, Grundlagen, Behandlungskonzept, Vorbehandlung, 4. Aufl., Quintessenz Verlags GmbH, Berlin, Barcelona, Beijing, Chicago, Istanbul, Kopenhagen, London, Mailand, Moskau, Neu-Delhi, Paris, Prag, São Paulo, Seoul, Tokio, Warschau.

Sun Y., Shu R., Li C.-L., Zhang M.-Z., 2010. Gram-Negative Periodontal Bacteria Induce the Activation of Toll-Like Receptors 2 and 4, and cytokine Production in Human Periodontal Ligament Cells. J. Periodontol. 81, 1488-1496.

Tiranathagul S., Yongchaitrakul T., Pattamapun K., Pavasant P., 2004. *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide activates matrix metalloproteinase-2 and increases receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand expression in human periodontal ligament cells. J. Periodontol. 75, 1647-1654.

Vollmar A., Dingermaier T., 2005. Immunologie – Grundlagen und Wirkstoffe, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 20ff.

Wada N., Maeda H., Yoshimine Y., Akamine A., 2004. Lipopolysaccharide stimulates expression of osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappa B ligand in periodontal ligament fibroblasts through the induction of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. Bone. 35, 629-635.

Weber T., 2003. Memorix Zahnmedizin, 3. Aufl., G. Thieme Verlag, Stuttgart.

Yamaguchi M., Aihara N., Kojima T., Kasai K., 2006. RANKL increase in compressed periodontal ligament cells from root resorption. J. Dent. Res. 85, 751-756.

Yamaguchi M., 2009. RANK/RANKL/OPG during orthodontic tooth movement. *Orthod. Craniofac. Res.* 12, 113-119.

Yamamoto T., Kita M., Kimura I., Oseko F., Terauchi R., Takahashi K., Kubo T., Kanamura N., 2006. Mechanical stress induces expression of cytokines in human periodontal ligament cells. *Oral Dis.* 12, 171-175.

Yamamoto T., Kita M., Yamamoto K., Akamatsu Y., Oseko F., Kanamura N., 2011. Mechanical stress enhances production of cytokines in human periodontal ligament cells induced by *Porphyromonas gingivalis*. *Arch. Oral. Biol.* 56, 251-257.

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Aufbau des Zahnhalteapparates	2
Abbildung 2:	Mikroskopischer Aufbau des Zahnes und des Parodontiums von einer Ratte	3
Abbildung 3:	Mikroskopischer Aufbau des Parodontiums	3
Abbildung 4:	Humane Primärzellkultur von PDL-Zellen	5
Abbildung 5:	TLR-Signalweg ausgelöst durch bakterielle Lipopolysaccharide	6
Abbildung 6:	In Zahnfilmen sichtbare vertikale und horizontale Knochen- einbrüche	7
Abbildung 7:	Kultur von <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	10
Abbildung 8:	Kultur von <i>Fusobacterium nucleatum</i>	10
Abbildung 9:	Entwicklungsstadien der Parodontitis	11
Abbildung 10:	Schematische Darstellung der Vorgänge im Kieferknochen, ausgehend von orthodontischen Kräften und resultierend im Knochenabbau	14
Abbildung 11:	Arachidonsäurestoffwechsel	16
Abbildung 12:	Mikroskopischer Schnitt durch den Zahn und das Parodont mit eingefärbten Osteoklasten und Howship-Lakunen	17
Abbildung 13:	Mikroskopische Aufnahme der eingefärbten Osteoklasten und Howship-Lakunen	17
Abbildung 14:	Abschaben des parodontalen Ligaments mittels einer Kürette	24
Abbildung 15:	Auswachsende PDL-Zellen (spindelförmig) aus einem Wurzel- hautfragment (braun)	25
Abbildung 16:	Die vier verschiedenen Gruppen des Druckexperimentes	32
Abbildung 17:	Versuchsaufbau der mit Kraftapplikation behandelten Gruppe	32
Abbildung 18:	Layout der PCR-Platten im PC für die versch. Versuchsgruppen	36
Abbildung 19:	Ablauf der Real-Time-PCR	37

Abbildung 20:	Verlauf der RT-PCR mit Darstellung des Fluoreszenzschwellenwertes	37
Abbildung 21:	Schematische prinzipielle Darstellung eines Western-Blot Proteintransfers	42
Abbildung 22:	Nachweis von RANKL im Gesamtprotein mittels eines Western-Blots bei den verschiedenen Versuchsgruppen	43
Abbildung 23:	Angefärbte osteoklastenähnliche Zellen in der Co-Kultur von PDL-Zellen (spindelförmig) und RAW 264.7-Zellen (rund)	46
Abbildung 24:	Proliferierende PDL-Zellen (spindelförmig) aus einem isolierten Wurzelhautfragment (braun) mit einzelnen apoptotischen Zellkörperchen	47
Abbildung 25:	Bandenmuster einer Agarose-Gelelektrophorese zur Identifikation von PDL-Zellen mit Standardkontrolle links in 100 bp Schritten	48
Abbildung 26:	Normalisierte Genexpression von OPG bei den verschiedenen Versuchsgruppen	49
Abbildung 27:	Normalisierte Genexpression von RANKL bei den verschiedenen Versuchsgruppen	50
Abbildung 28:	Verhältnis von RANKL zu OPG bei den verschiedenen Versuchsgruppen	52
Abbildung 29:	Normalisierte Genexpression von OPG bei den verschiedenen Versuchsgruppen	53
Abbildung 30:	Normalisierte Genexpression von RANKL bei den verschiedenen Versuchsgruppen	55
Abbildung 31:	Verhältnis von RANKL zu OPG bei den verschiedenen Versuchsgruppen	56
Abbildung 32:	Nachweis von RANKL in PDL-Zellen	57
Abbildung 33:	Anzahl der osteoklastenähnlichen Zellen/Well für die jew. Versuchsgruppen	58
Abbildung 34:	Rotgefärbte osteoklastenähnliche Zellen in der Co-Kultur von PDL-Zellen (spindelförmig) und RAW 264.7-Zellen (rund)	59

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete technische Zubehöre und Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller	18f.
Tabelle 2:	Verwendete Chemikalien und Biochemikalien und deren Hersteller	20f.
Tabelle 3:	Basensequenzen der Primer für die c-DNA-Synthese	27
Tabelle 4:	Sequenzen und Ampliconlängen der verwendeten Primer für die PCR	28
Tabelle 5:	Ablauf der PCR	29
Tabelle 6:	Bestandteile und Herstellung eines 1× Tris-Acetat-EDTA-Puffers	29
Tabelle 7:	Protokoll zur Passagierung der Zellen	30
Tabelle 8:	Protokoll zur Bestimmung der Zellzahl	31
Tabelle 9:	Sequenzen und Ampliconlängen der verwendeten Primer für die RT-PCR	35
Tabelle 10:	Zusammensetzung des 12%igen SDS-Trenngels und des Sammel- gels	40
Tabelle 11:	Bestandteile und Herstellung einer 1× SDS-Laufpufferlösung	41
Tabelle 12:	Bestandteile und Herstellung einer 10× Blotpuffer-Lösung	41
Tabelle 13:	Bestandteile und Herstellung einer 1× TBS-T Lösung	42
Tabelle 14:	Basenpaarlängen der diversen untersuchten Gene	48
Tabelle 15:	Vergleich der Genexpression von OPG	50
Tabelle 16:	Vergleich der Genexpression von RANKL	51
Tabelle 17:	Vergleich des RANKL/OPG-Verhältnisses	52
Tabelle 18:	Vergleich der Genexpression von OPG	54
Tabelle 19:	Vergleich der Genexpression von RANKL	54
Tabelle 20:	Vergleich des RANKL/OPG-Verhältnisses	56
Tabelle 21:	Anzahl der osteoklastenähnlichen Zellen/Well	58

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AA	Antibiotikum/Antimykotikum
ALP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF	Activating transcription factor
bp	Basenpaare
BSP	Bone-Sialo-Protein
C	Cytosin
CD	Cluster determinants
c-DNA	complementary-Desoxyribonukleinsäure
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
COX	Cyclooxygenase
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
FCS	Fötales Kälberserum
G	Guanin
gesätt.	gesättigt
HCl	Salzsäure (Hydrogenchlorid)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	Humanes Immunschwäche Virus
IgG	Immunoglobulin G



IKK	Inhibitor of Nuclear factor $\kappa$ of activated B-cells (NF $\kappa$ B) Kinase
IL	Interleukin
IRAK	Interleukin-1-receptor-associated kinase
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert
M	Mol
MAP-Kinasen	Mitogen-activated protein kinases
MD	Myeloid differentiation
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar
mM	Millimolar
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MyD88	Myeloid differentiation primary-response gene 88
N/cm <sup>2</sup>	Newton pro Quadratzentimeter
NaOCl	Natriumhypochlorit
ng/ $\mu$ l	Nanogramm pro Mikroliter
NF $\kappa$ B	Nuclear factor $\kappa$ of activated B-cells
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OPG	Osteoprotegerin
OPT	Orthopantomogramm
PBS	Phosphate-buffered-Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDL	Parodontalligament
PG	Prostaglandin

PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
pmol/l	Pikomol pro Liter
pmol/μl	Pikomol pro Mikroliter
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor κ
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor κ Ligand
RNA	Ribonukleinsäure
RTase	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Echtzeit Polymerasekettenreaktion
sRANKL	lösliches RANKL
SDS	Natriumduodecylsulfat
T	Thymin
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAK	Transforming growth factor kinase
TBS-T	Tris-buffered-Saline-Tween 20
TEMED	Tetramethyldiamin
TLR	toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiertes-Faktor
TRAP	Tartrate Resistant Acid Phosphatase
TRIF	Toll/Interleukin receptor-domain-containing adaptorprotein inducing interferon-β
U	Units
U/μl	Units pro Mikroliter
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Vol.	Volumen

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die hier vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bislang keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Mintraching, 30.04.2013

## **Danksagung**

Im März 2011 habe ich die vorliegende Doktorarbeit in der Poliklinik für Kieferorthopädie am Universitätsklinikum Regensburg begonnen. Mit dem heutigen Tag endet für mich ein besonders interessanter, herausfordernder aber auch arbeitsintensiver Lebensabschnitt.

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Peter Proff für die Überlassung dieses interessanten Themas und die äußerst wohlwollende Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Piero Römer für seine sehr freundliche und hervorragende Betreuung. Es hat mich besonders gefreut, dass Herr Dr. Römer zu jeder Zeit als Ansprechpartner zur Verfügung stand und sich laufend über den praktischen und schriftlichen Fortschritt erkundigt hatte.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Frau Dipl. Biol. Kathrin Bauer und Frau MTA Bernadette Fürnstein für die intensive Einweisung in den mikrobiologischen Alltag und die stets freundliche Betreuung und die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Josef Köstler für die Anzüchtung und Kultivierung der Bakterienkulturen.

Aufrichtig möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jochen Fanghänel für die freundliche Betreuung und die Korrekturlesung dieser Arbeit bedanken.

Ich bedanke mich sehr bei Herrn Prof. Dr. Michael Behr für die Korrektur dieser Arbeit in seiner Funktion als Zweitgutachter.

Besonders bedanke ich mich bei Herrn Dipl. Psych. Axel Bartsch für die aktive Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse dieser Dissertation.

Vor allem bedanke ich mich bei meinen Eltern für die liebevolle Unterstützung während dieser Arbeit und meines gesamten Zahnmedizinstudiums, insbesondere für die mehrmaligen Korrekturlesungen dieser Arbeit im Hinblick auf eventuelle sprachliche und formale Fehler.

Mintraching, den 30.04.2013